

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/04609

14.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 4月12日

REC'D 18 JUL 2003

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-111377

[ST.10/C]:

[JP2002-111377]

WIPO

PCT

出 願 人

Applicant(s):

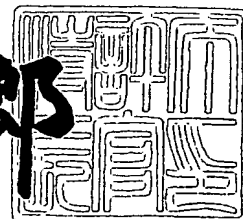
学校法人 久留米大学

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 3日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3036749

【書類名】 特許願
【整理番号】 1020402-02
【提出日】 平成14年 4月12日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】

【住所又は居所】 福岡県久留米市南薫西町 2024

【氏名】 常岡 誠

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県久留米市小頭町 11-3-902

【氏名】 木村 博司

【特許出願人】

【住所又は居所】 福岡県久留米市旭町 67

【氏名又は名称】 学校法人久留米大学

【代表者】 平野 実

【代理人】

【識別番号】 100080160

【弁理士】

【氏名又は名称】 松尾 憲一郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100114661

【弁理士】

【氏名又は名称】 内野 美洋

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003230

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 がん関連遺伝子 *mina53* およびそのタンパク質 *Mina53*

【特許請求の範囲】

【請求項1】 がん関連遺伝子 *mina53* が10個のエクソンから構成され、最上流側にエクソン1が転写開始部位として存在し、エクソン2に翻訳開始部位が存在し、最後のエクソン10に停止コドンが存在することを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項2】 請求項1に記載するがん関連遺伝子 *mina53* において、エクソン1がエクソン1aとエクソン1bとからなり、エクソン1bがエクソン1aの0.25kb下流に存在することを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項3】 請求項1または2に記載するがん関連遺伝子 *mina53* において、エクソン5とエクソン6との間にエクソン5'が存在することを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項4】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子 *mina53* において、前記がん関連遺伝子 *mina53* が配列番号1で示される塩基配列を有するヒトがん関連遺伝子 *mina53* であることを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項5】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子 *mina53* において、前記がん関連遺伝子 *mina53* が配列番号2で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子 *mina53* であることを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項6】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子 *mina53* において、前記がん関連遺伝子 *mina53* が配列番号3で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子 *mina53* であることを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項7】 請求項1ないし6に記載するがん関連遺伝子 *mina53* において、前記がん関連遺伝子 *mina53* が分子量53kDaを有するタンパク質をコードしていることを特徴とするがん関連遺伝子 *mina53*。

【請求項8】 請求項1ないし7のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子 *mi*

na53において、前記がん関連遺伝子mina53が該遺伝子の発現を調節する転写因子であるMyctanパク質が結合する塩基配列を持っていることを特徴とするがん関連遺伝子mina53。

【請求項9】請求項1ないし8に記載するがん関連遺伝子mina53において、前記タンパク質が核小体に局在していることを特徴とするがん関連遺伝子mina53。

【請求項10】請求項1ないし9のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子mina53において、前記がん関連遺伝子mina53の発現がc-myc遺伝子によって誘発されることを特徴とするがん関連遺伝子mina53。

【請求項11】請求項4に記載するがん関連遺伝子mina53において、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有する細胞増殖作用を有するヒトタンパク質Mina53。

【請求項12】請求項1ないし10のいずれか1項に記載のがん関連遺伝子mina53をコードしていることを特徴とするプラスミド。

【請求項13】請求項11に記載のヒトタンパク質Mina53をコードしていることを特徴とするプラスミド。

【請求項14】請求項1ないし10のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子mina53の特定部位を含むヒトmina53ゲノミックDNAフラグメントを、ルシフェレースcDNAに結合することを特徴とするレポータープラスミド。

【請求項15】請求項1ないし10のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子mina53または請求項11に記載するヒトタンパク質Mina53もしくはそのフラグメントを抗原として抗体を得ることを特徴とするmina53もしくはMina53に対する抗体。

【請求項16】請求項1ないし10のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子mina53もしくはそのフラグメントを用いてMina53発現調節をするための核酸であることを特徴とするMina53発現調節のための核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、がん関連遺伝子 *mina 53* およびそのタンパク質 *Mina 53* に関する。

【0002】

【従来の技術】

前がん遺伝子 *myc* ファミリーは、特にがんとの関連は古くから知られていて、がん、個体発生などにおいて重要な役割を果たしている細胞増殖関連の遺伝子である。特にがんとの関連は古くから知られていて、ヒトがんにおいては非常に高い割合でこの遺伝子の異常が見つかっている。

このがん遺伝子 *c-myc* ファミリーは、主に3つの遺伝子 *c-myc* と、*N-myc* と、*L-myc* とから構成されている。3つの遺伝子は発現する場所とタイミングが異なっているが、基本的には同じ生物学的活性を持つと考えられている。このがん遺伝子 *c-myc* の発現は、転写レベルと転写後レベルなどのレベルで高度に調節されている。一般的には、*c-myc* の発現は、細胞増殖に関連していて、静止期にある細胞あるいは分化細胞中においてその発現が低下する。遺伝子増殖、ウイルスプロモーター挿入、染色体の転座もしくはプロモーター突然変異などによって、*myc* ファミリー遺伝子が脱調節されて異常に発現することは、ヒトなどの広い範囲の脊椎動物における新形成疾患（いわゆる腫瘍形成等）に関連している (DePinho, R. A. et al. (1991) *Adv. Cancer Res.* 57, 1-46; Marcu, K. B. et al. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 809-860; Morgenbesser, S. D. et al. (1994) *Semin. Cancer Biol.* 5, 21-36; Henriksson, M. et al. (1996) *Adv. Cancer Res.* 68, 109-182; Grandori, C. et al. (2000) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 653-99)。*c-myc* もしくは *N-myc* をノックアウトしたマウス胎児は、胚発生中期の間に多臓器発育不全を誘発し死亡する (Stanton, B.R. et al. (1992) *Genes Dev* 6, 2235-2247; Sawai, S. et al. (1993) *Development* 117, 1445-1455; Davis, A.C. et al. (1993) *Genes Dev.* 7, 671-682)。これらの結果は、*myc* が細胞発育の中心的調節因子であることを示している (Henriksson, M. and Luscher, B. (1996) *Adv. Cancer Res.* 68, 109-182; Grandori, C. et al. (2000) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 6

53-99; Luscher, B. (2001) *Gene* 277, 1-14)。しかしながら、この遺伝子 *myc* の機能発揮のメカニズムは未だ明らかではない。

【0003】

このがん遺伝子 *myc* ファミリーの遺伝子は、種々の遺伝子の発現を調節する転写因子 (*My c* タンパク質) をコードしている (Grandori, C. et al. (2000) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 653-99; Luscher, B. (2001) *Gene* 277 (Oct 17; (1-2):), 1-14)。 *My c my c* ファミリー遺伝子がコードしているタンパク質は、転写因子の基本ヘリックスループヘリックスジッパーベーシックヘリックスループヘリックスジッパー (bHLHZBHLHZ) クラスの転写因子の1員である。 *My c* タンパク質とその必須相手の *Max* との2量体は、配列特異的DNA結合活性を有するヘテロ2量体を形成する。し、 *My c - Max* ヘテロ2量体は、Eボックス部位 (主にCACGTGエレメント) に結合したときにする。、 *My c* のにはその他に転写活性化 (transactivation) ドメインをがあり、これらのドメインの働きを通して使用して遺伝子の転写を活性化する。例えば、ODC (Bello-Fernandez, C. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7804-7808)、 *c d c 2 5 A* (Galaktionov, K. et al. (1996) *Nature* 382, 511-517)、 *R C C 1* (Tsuneoka, M. et al. (1997) *Oncogene* 14, 2301-2311)、 *c y c l i n D2* (Bouchard, C. et al. (2000) *Genes & Dev* 15, 2042-2047)、 *I d 2* (Lasorella, A. et al. (2000) *Nature* 407, 592-598) などの数々の *My c* 標的遺伝子が同定されている (Dang, C.V. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 1-11)。機能を持つ *c - my c* 遺伝子を完全に欠損した細胞に、発現遺伝子ライブラリーを導入し、正常な増殖を再確立する遺伝子を同定する試みは、 *c - my c* ならびに *N - my c* を繰り返して同定するだけの結果に終わった。これらの結果は、 *my c* が単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子を制御して細胞周期を調節していることを示唆している。おそらく、 *c - my c* は、これら1セットの遺伝子を制御し、細胞生育に寄与するものと考えられる。このような遺伝子 (*My c* 標的遺伝子) はがん遺伝子 *my c* により調節されていると考えられているがしかし、がん遺伝子 *my c* の機能を解明するのに十分な *My c* 標的遺伝子が未だ同定されていないのが現状です。更に、 *my c* の機能はな

おなぞのままであり、c-そこでmycによって制御されるその他の新規な遺伝子はMy cの機能の解明に役立つことができる。

【0 0 0 4】

そこで、本発明者らは、がん遺伝子mycの機能を説明するのに十分なMy c標的遺伝子を同定すべく鋭意検討し研究した結果、新しいMy c標的遺伝子を見出して、この発明を完成した。

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

この発明は、がん遺伝子mycの機能を説明することができるMy c標的遺伝子であるヒト、マウスもしくはラットmin a 5 3 遺伝子またはヒト、マウスもしくはラットのタンパク質M i n a 5 3 を提供することを目的とする。

また、この発明はmin a 5 3 遺伝子をコードしているプラスミドならびにレポータープラスミドを提供することを目的とする。

更に、この発明は、min a 5 3 遺伝子またはヒトタンパク質M i n a 5 3 もしくはそのフラグメントを抗原として得られる抗体を提供することを目的とする。

【0 0 0 6】

その上、この発明は、かかる新規なMy c標的遺伝子によってがん細胞の増殖抑制をすることを目的とする。

この発明のその他の目的、特長ならびに利点は本明細書の記載から明白となるものと理解できる。

【0 0 0 7】

【課題を解決するための手段】

この目的を達成するために、この発明は、新規なMy c標的遺伝子であるがん関連遺伝子を提供する。なお、この発明において、このがん関連遺伝子をmin a 5 3 と称することにする。

この発明の態様の1つとして、この発明は、がん遺伝子mycによって直接発現調節を受けるとともに、配列表の配列番号1に示す塩基配列ならびにアミノ酸配列を有し、かつ、分子量5万3千(53 k D a)の核タンパク質をコードして

いるがん関連遺伝子 *mina53* を提供する。また、この発明は、その1つの好ましい態様として、がん細胞の増殖に関連していること、またがん組織において特異的に発現が上昇するがん関連遺伝子 *mina53* を提供する。この発明の別の好ましい態様として、分子量 53 kDa を有するタンパク質をコードしているがん関連遺伝子 *mina53* が提供される。その上、この発明では、その好ましい別の態様として、核酸および核小体に局在しているところのまたはその発現が *c-myc* 遺伝子によって誘発されるところのがん関連遺伝子 *mina53* が提供される。

【0008】

更に、この発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する細胞増殖作用を有するヒトタンパク質 *Mina53* を提供する。

したがって、これらの諸機能を利用して、この発明に係る *mina53* 遺伝子ならびにそのタンパク質である *Mina53* タンパク質は後述するように様々な有用な応用ができる。

【0009】

この発明はまた、配列番号2で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子 *mina53* または配列番号3で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子 *mina53* を提供する。この発明による配列番号3で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子 *mina53* および配列番号2で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子 *mina53* は、その細胞増殖作用を調べるのに有用である。

【0010】

この発明は、別の態様として、この発明に係るがん関連遺伝子 *mina53* をコードしているプラスミドを提供する。

また、この発明は、その別の態様として、*mina53* ゲノミックDNAフラグメントを有するレポータープラスミドを提供する。

【0011】

更に、この発明は、別の態様として、*Mina53* タンパク質に対する抗体を提供する。この発明に係る抗体は、例えば、がんの診断やがんの治療に利用する

ことができるとともに、がん細胞などの正常でない細胞の診断や、細胞の状態の診断などにも利用することができる。

【 0 0 1 2 】

この発明は、更に別の態様として、がん関連遺伝子 *mina53* の発現を調節する方法を提供する。がん関連遺伝子 *mina53* の発現を調節することによって、例えば、がん細胞の増殖を抑制することが可能になる。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の態様】

この発明に係るがん関連遺伝子 *mina53* の cDNA 配列を含むヒトゲノミック DNA 配列は HTGS (GenBank Acc: AC026100, AC073245, AC024892) に見出すことができる。なお、イントロン 2 (エクソン 2 とエクソン 3 との間) の長さは GenBank のデータ中で異なっているため、エクソン 2 とエクソン 3 の配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR で増幅し、その長さを 5.2 kb であることを決定した。

この発明に係るがん関連遺伝子 *mina53* は配列表の配列番号 1 で示される塩基配列ならびにアミノ酸配列を有する。更に詳細には、図 1 に示すように、この発明のがん関連遺伝子 *mina53* のうち、ヒト *mina53* 遺伝子は 12 個のエクソンから構成され、最上流側に 2 個のエクソン 1a とエクソン 1b とは 2 個の転写開始部位として存在し、エクソン 2 に翻訳開始部位が存在するとともに、最後のエクソン 10 に停止コドン (TAG) が存在している。また、エクソン 1b は、エクソン 1a の 0.25 kb 下流に存在する。更に、主 cDNA の中央部、すなわちエクソン 5 とエクソン 6 との間に挿入された 101 bp の配列がエクソン 5' として存在している cDNA もある。464 個のアミノ酸 (297 Q を欠失している) をコードする cDNA は、エクソン 7 の最初の 3 bp を欠失している。UCSC Genome Browser のマッピングデータは、*mina53* 遺伝子が第 3 番染色体 (3q12.1) にマップされていることを示している。

【 0 0 1 4 】

更に、この発明に係るがん関連遺伝子 *mina53* は、その発現ががん遺伝子 *c-myc* によって直接誘発され、また分子量 53 kDa を有するタンパク質をコードしていて、そのタンパク質は核質および核小体に存在している。更に、*mina53* の発現を特異的に阻害すると、細胞増殖が著しく抑制される。

【0015】

この発明に係る新規な遺伝子 *mina53* は cDNA マイクロアレイ手法を使用して同定することができる。使用できる cDNA マイクロアレイ法としては、DNA チップ (cDNA マイクロアレイ) などの当該技術分野において慣用されている種々の手法を使用することができる。例えば、未処理の T98G *myc* er-2 細胞 (後述する) と、エストロゲンの誘導体 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) で 20 時間処理した同細胞から全 RNA を単離することができる。ポリ (A+) RNA は回収し、市販の DNA チップを用いて示差ディスプレイに適用することができる。DNA チップには、発現配列タグ (EST: Expression Sequence Tagged) クローンを含む約 9 千種類もしくはそれ以上の cDNA をプレートすることができる。当然ながら、この発明はかかる技術に一切限定されるものではなく、当該技術において使用できる技術であればいずれの技術であっても使用することができる。

【0016】

この発明において使用する *c-myc* をコードするプラスミドは、当該分野においては慣用されている手法によって作製することができる。使用するプラスミドにしても種々のプラスミドが市販されていて、目的に応じて適宜選択することができる。この発明において使用する *c-myc* をコードするプラスミドとしては、例えば、ヒト *c-myc* を CMV プロモーターによって発現誘導する *Pc-myc/CDM8* (Tsuneoka, M. et al. (1997) *Oncogene* 14, 2301-2311)、あるいはそれを、*Pst* I で消化し、自己ライゲートして作製された活性化ドメインが欠如している変異型 *c-Myc* タンパク質をコードする *pc-myc (d41-178)/CDM8*、*pTc-mycer/BS* の *Bst* XI-K *p*n I フラグメントを、*pCAGGS* 哺乳動物発現ベクターの *Eco* RI フラグメント中に挿入し、*c-mycer* をチキン-アクチンと CMV プロモーターとから構成さ

れたキメラプロモーター下に挿入して作製されたp c-mycer/CAGGSなどを使用することができる。

【0017】

この発明に係るmina53をコードするプラスミドは当該分野においては慣用されている手法によって作製することができる。使用するプラスミドにしても種々のプラスミドが市販されていて、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、ヒトmina53に対するcDNAを、ヒト赤血球白血病細胞(HEL)ライブラリーからの5'-GAAGCTTATGCCAAAGAAAGCAAAGCCTACAGG-3'(開始コドンのメチオニンの直前にHindIII部位を追加)と、5'-TGAATTCATCCTCTCCTCGGCTCAGGTCTT-3'をプライマーとして使用してPCRによって増幅し、増幅したフラグメントを特定のベクター中にクローン化して、それぞれ465個ならびに464個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするpT/hmina53(465)ならびにpT/hmina53(464)とを作製することができる。このpT/hmina53(465)のHindIII-SalIフラグメントからpEGFP/hmina53(465)(GFP-Mina53融合タンパク質を合成する)を作製することができる。また、HindIIIとNotIとで消化したpT/hmina53(465)のHindIII-NotIフラグメントからphmina53/Rc/CMVを作製することができる。更に、ヒトmina53をコードするDNAフラグメントを、pEGFP/hmina53(465)からの5'-GCCATGCCATGGCAAAGAAAGCAAAGCCTAC-3'(NcoI部位を追加)と、5'-GGCATGCCATGGCTAGACTACTTGAATTAAAC-3'(NcoI部位を追加)とをプライマーとして用いてPCRで増幅し、増幅したフラグメントを、NcoIで消化したE. coli発現ベクターpETに挿入して、pET/hmina53を作製することができる。pEGFP/hmina53(465)のXhoI-SalIフラグメントをベクター中に挿入して、pGEX-hmina53(GST-Mina53融合タンパク質)を作製することができる。

【0018】

また、この発明では、*mina 53* 遺伝子のプロモータ活性を調べるために、その特定部位を含むヒト *mina 53* ゲノミック DNA フラグメントをルシフェラーゼ (*luciferase*) cDNA に結合して、常法によりレポータープラスミドを構築することができる。DNA フラグメントがプロモータ活性を有していることは T98G 細胞中でのトランジェント発現アッセイによって調べることができる。

【0019】

この発明においては、*Mina 53* タンパク質に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの *Mina 53* タンパク質に結合する物質も、当該技術分野に慣用されている手法により作製することができる。

【0020】

【実施例】

(*c-myc* をコードするプラスミド)

ヒト *c-myc* を CMV プロモーター下に導入した *P c-myc* / CDM8 (Tsunooka, M. et al. (1997) *Oncogene* 14, 2301-2311) を用いた。またこのプラスミドを、*Pst* I で消化し、自己ライゲートして、活性化ドメインが欠如している変異型 *c-Myc* タンパク質をコードする *p c-myc* (d41-178) / CDM8 を作製した。*p T c-myc er* / BS の 2 kb の *Bst* XI - *Kpn* I フラグメント (*Klenow* Enzyme で平滑化した) を、*p CAGGS* 哺乳動物発現ベクターの 5 kb の *Eco* RI フラグメント (*Klenow* Enzyme で平滑化し、*E. coli* アルカリホスファターゼによって脱リン酸化した) 中に挿入して、*c-myc er* がチキン-アクチンプロモーターと CMV プロモーターとから構成されたキメラプロモーター下に挿入した *p c-myc er* / CAGGS を作製した。

【0021】

(*mina 53* をコードするプラスミド)

ヒト *mina 53* に対する cDNA を、ヒト赤血球白血病 (HEL) ライブラリからの 5' -GAAGCTTATGCCAAAGAAAGCAAAGCCTACAGG-3' (開始コドンのメチオニンの直前に *Hind* III 部位を追加)

と、5' -TGAATTCATCCTCTCCTCGGCTCAGGTCTT-3' をプライマーとして使用してヒト赤白血病細胞 (HEL) ライブラリーからPCRによって増幅した。増幅した1.4 kbのフラグメントをpGEM-Tベクター (プロメガ社製) 中にクローン化して、それぞれ465個ならびに464個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするpT/hmina53 (465) ならびにpT/hmina53 (464) とを作製した。pT/hmina53 (465) の1.4 kbのHindIII-SalIフラグメントを、HindIIIとSalIとで切断したpGFP-C3 (クロンテック社製) を用いて伸長してクローン化し、pEGFP/hmina53 (465) を作製した。HindIIIとNotIとで消化したpT/hmina53 (465) の1.4 kbのHindIII-NotIフラグメントを、pRc/CMV (インビトロジェン社製) 中に挿入して、phmina53/Rc/CMVを作製した。ヒトmina53をコードするDNAフラグメントを、pEGFP/hmina53 (465) からの5' -GCCATGCCATGGCAAAGAAAGCAAGCCTAC-3' (NcoI部位を追加) と、5' -GGCATGCCATGGCTAGACTACTTGAATTAAAC-3' (NcoI部位を追加) とをプライマーとして用いて、ヒトmina53をコードするDNAフラグメントを、pEGFP/hmina53 (465) からPCRで増幅し、増幅した1.4 kbフラグメントを、E. coli発現ベクターpET11d (ノバジェン社製) (NcoIで切断し、E. coliアルカリホスファターゼで脱リン酸化した) を用いて伸長に挿入し、pET/hmina53を作製した。pEGFT/hmina53 (465) の1.4 kbのXhoI-SalIフラグメント (Klenow Enzymeで平滑化した) を、pGEX-3X (ファルマシア社製) (EcoRIで消化して、Klenow Enzymeで平滑化し、E. coliアルカリホスファターゼで脱リン酸化した) 中に挿入して、pGEX-hmina53を作製した。

【0022】

(mina53のゲノミックDNAフラグメントを有するレポータープラスミド)

そのプロモーター領域からイントロン1に伸長しているヒト *mina53* 遺伝子のゲノミックDNAフラグメントを、プライマーとして5' -CGGGATCCTGAACGCGGAACACCGCCGGGTAGC-3' (BamHI部位を追加) と、5' -CCCAAGCTTCCTCTTCTCCAGTCTATCCTTC-3' (HindIII部位を追加) とを用いて、ヒト *mina53* 遺伝子のプロモーター領域からイントロン1の一部までのゲノムDNA断片を、ヒト末梢血由来のDNAを鋳型としPCRで増幅した。その増幅した0.8 kbのフラグメントを、BamHIとHindIIIとで切断した後、BglIIとHindIIIとで切断したpGL3 (プロメガ社製) の4.8 kbフラグメント中に挿入して、pMina (W) luciferaseを作製した。pMina (W) luciferaseをHindIIIとPmaCIで切断し、Klenow Enzymeで平滑化し、自己連結してpMina (dE) luciferaseを作製した。つぎに、GeneEditorインビトロ (in vitro) 部位指向突然変異システム (プロメガ社製) を用いて、pMina (W) luciferaseのE-ボックス部位に突然変異を導入し、その2個のE-ボックス (CACGTGエレメント) の一方もしくは両方をCACCTGに変異したpMina (mE1) luciferaseと、pMina (mE2) luciferaseと、pMina (mE1/2) luciferaseとを作製した。

【0023】

(その他のプラスミド)

アクチンプロモーターのコントロール下においてハイグロマイシン抵抗遺伝子を含むpActHygプラスミドはDr. M. Nakanishiから贈与されたものである (Tsuneoka, M. et al. (1997) Oncogene 14, 2301-2311)。CMVプロモーターのコントロール下でRenilla reniformis luciferase遺伝子を含むpRL-CMVプラスミドは市販されているもの (プロメガ社製) を入手した。

【0024】

(RNAの調製とノーザンブロット分析)

RNAは、DEPCで処理した市販のRNA調製液セット (ナカライテスク社製) を用いて、酸グアニジウム・チオシアネート・フェノール・クロロホルム抽

出法によって細胞から単離した。抽出したRNAは、ホルムアルデヒド含有アガロースゲルを用いて電気泳動をし、ハイボンドN（アマシャム社製）に転写し、 ^{32}P で標識したcDNAプローブで検出した。プローブは、市販のMultiprimeラベリングキット（アマシャム社製）を用いて $[\alpha-^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した。結果はBAS200イメージ分析（富士フィルム社製）を用いて定量した。

【0025】

（プローブDNAの調製）

c-mycと、mina53と、CD18とのDNAプローブは次のようにして調製した。

c-myc：

ヒトc-myc cDNAを含有するp c-myc/CDM8からの1.6 kbのHindIII-XbaIフラグメントを調製した(Tsuneoka, M. et al. (1997) Oncogene 14, 2301-2311)。

mina53：

上記pEGFP/hmina53 (465) からの5' -CAGAGCTGTCAACACCAGGTGGAAAGTTAC-3' と、5' -TGAATTCATCCTCTCCTCGGCTCAGGTCTT-3' とをプライマーとして使用して、PCR法にて増幅して得られた442 bpのフラグメント。

CD18：

TPA 10 nM中で24時間培養したHL60細胞から単離した全RNAからの5' -GTTTGCCACTGATGACGGCTTCCATTC-3' と、5' -AACACGCACCTAACCTCACCAACCTCAA-3' とをプライマーとして使用して、RT-PCR法にて増幅して得られた1.8 kbのフラグメント。CD18 cDNAの配列は直接シーケンス法によって確認した。

【0026】

5' -RACEおよびRT-PCRプロトコルについて説明する。

（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR））

各プライマー10 pmoleと、EX Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社

製) 1. 2 Uと、dNTP 200 μ Mとを含むEXTaqバッファ50 μ Lを用いて増幅を行った。

(5' - RACE (Rapid Amplification of 5' cDNA Ends) 分析)

HEL細胞のポリ (A) + RNA (1 μ g) から、逆転写反応、2重鎖cDNA合成およびアダプターライゲーションを、マラソン (Marathon) cDNA増幅キット (クロンテック社製) を用いて行った (Koda, Y. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 7501-7505)。第1PCRは、プライマーとして、mina 53-RACE-1 (5' - GCAGTACTGTGAGGACAATGTG GTCTT-3') と、AP1プライマーとを使用して行った。温度プロファイルは、94℃で1分間の初期熱変性後、96℃での15秒間の熱変性工程、68℃での3分間のアニーリング工程と伸張工程とを1サイクルとして25サイクルの処理をした。上記第1RACE-PCR生産物を1000倍希釈した液1 μ LをネストRACE-PCRのためのテンプレートとして使用した。ネストRACE-PCRは、mina 53-RACE-2 (5' - CAACCAAGGAGC CAAAGTAACATTC-3') と、AP2プライマーとを使用して行った。温度プロファイルは、94℃で1分間の初期熱変性後、96℃での15秒間の熱変性工程、68℃での4分間のアニーリング工程と伸張工程とを1サイクルとして25サイクルの処理をした。

【0027】

(RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR))

HELもしくはRCN-9細胞もしくはマウスの胃の細胞の一本鎖cDNAを、市販のSuperscript一本鎖cDNA合成キット (インビトロジェン社製) を用いて全RNA (1 μ g) に対して合成した。得られた1重鎖cDNA 1 μ l (全量20 μ l) をPCRの鋳型として使用した。増幅用のRT-PCR用プライマーとしては、ヒトに対しては、mina 53 RT-F (5' - ACCGGTGACGAGCGCACGGAAAG-3') と、mina 53 RT-R (5' - GCCTCTCATCTGTGGGGAAGTATTA-3') とを、ラットとマウスに対しては、ラットmina 53 RT-F (5' - TTTC

CTCCCTACTTGTGAACAATGC-3') と、ラット *mina 53* RT-R (5'-AATGATGCTCTTTAAAGGAGTTATTT-3') とを使用した。温度プロファイルは、98℃での15秒間の熱変性工程と、65℃での1分間のアニーリング工程と、72℃での2分30秒間の伸張工程を1サイクルとして35サイクルの処理をした。

【0028】

(細胞培養)

ヒト膠芽腫細胞株 T98G 細胞を非必須アミノ酸と10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有イーグル培地中で培養した。HeLa細胞、ラット繊維芽細胞株 3Y1 およびその誘導体を、10%FCS添加ダルベッコ補正イーグル培地中で培養した。ヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 を、20%FCS添加 RPMI 1640 培地中で培養した。ラット結腸がん細胞株 RCN-9 を、RIKEN細胞バンクから入手して、10%FCS添加 RPMI 1640 培地中で培養した。Myc または活性化ドメインを欠損した c-Myc を発現する 3Y1 細胞を確立するために、20 μ g の p c-myc / CDM8 もしくは p c-myc (d41-178) / CDM9 と、0.4 μ g の p Act Hyg とを用いて、カルシウムーリン酸方法によって、細胞に遺伝子導入した (Chen, C.A. et al. (1988) *Biotechniques* 6, 632-638)。得られた細胞は200 μ g/ml のハイグロマイシンを含有する培地中で2週間培養した。個々のクローンを単離し、c-Myc もしくは変異型 c-Myc タンパク質の発現を、抗 c-Myc 抗体を使用してウェスタンブロット分析法によって検出した。クローン 3Y1MycA と 3Y1MycB (c-Myc タンパク質を発現している) およびクローン 3Y1Myc (dTAD) A と 3Y1Myc (dTAD) B (大部分の活性化ドメインを欠損している変異型 c-Myc タンパク質を発現している) が確立された。c-Myc ER キメラタンパク質 (T98Gmycer-2) を発現する T98G 細胞を確立するために、20 μ g の p c-myc er / CAGGS と、0.4 μ g の p Act Hyg とを用いて、細胞を形質転換し、個々のクローン中の c-Myc ER の発現は上記のようにして検出し、T98Gmycer-2 を確立した。

【0029】

(DNAチップ(cDNAマイクロアレイ)を用いた示差ディスプレイ)

未処理のT98Gmycer-2細胞とOHTで20時間処理した細胞から全RNAを単離した。ポリ(A+)RNAを回収し、市販のDNAチップ(インサイト社製)を用いて示差ディスプレイに適用した。発現配列タグ(EST)クローンを含む約9千種類のcDNAをチップにプレートした(UniGEM Human V Ver. 2)。

【0030】

(トランジェント発現アッセイ)

T98Gmycer-2細胞を10%FCSを追加した培地中で生育した。 3×10^4 個の細胞をデイッシュ(12ウェルプレート; ウェルの直径: 22mm)中にプレートし、20~24時間培養した。 $1 \mu\text{g}$ のレポータープラスミドとインターナルマーカースとして20ngのpRL-CMVをFuGENE6試薬(ロッシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて細胞に導入した。レポーター遺伝子導入1日後、OHT(最終濃度が $0.2 \mu\text{M}$ になるように)を添加してMycERキメラタンパク質を活性化して、更に17時間培養した。次いで、細胞を回収して、firefly ルシフェレースならびにRenilla reniformis ルシフェレースの活性をデュアルルシフェレースレポーターアッセイ系(プロメガ社製)を用いて定量した。Renilla reniformis ルシフェレース活性値を用いて試料間の遺伝子導入程度を標準化した後、活性化MycERを有する細胞からのfirefly ルシフェレース活性を、MycER活性化していない細胞からの活性に対する比率として表した。MycERの活性化によらないOHTの効果を標準化するために、T98Gmycer-2細胞からの値を、上記T98Gmycer-2細胞と同一方法で処理したT98G親細胞からの値で割った値を求め、MycERキメラタンパク質の活性化に対するレポーター遺伝子の反能性反応性とした。なお、値は4回実験をしてその平均値で表している。

【0031】

(クロマチン免疫沈降)

クロマチン免疫沈降実験は、c-Mycに対する抗体ならびにコントロール抗

体を使用して行うとともに、抗体を使用しないコントロールも行った。この実験では、c-Mycに対する抗体は2種類使用した。1つはc-MycのN-末端側半分と反応し、もう1つはC-末端側半分に主に結合するものである。アッセイは基本的にはすでに発表された方法に従って行った (Boyd, K.E. et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2529-2537)。免疫複合体は、非特異的な結合を妨げるように処理をしたプロテインAビーズ (50%容量/容量) 20 μ l を添加することによって回収した。上記文献記載のようにして、ビーズを洗浄し、DNAフラグメントを溶出し、溶出した溶液をフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈降させた。免疫沈降したDNAフラグメントはPCRによって検出した。使用したPCRプライマーは、5' -GCCGGCGCTGTGGTTGC GGGACCTG-3' と、5' -TCCTCTTCCTCCCAGTCTAT CCTTC-3' であり、これらのプライマーを使用してヒト *mina 53* 遺伝子の転写開始部位の近くにE-ボックスを含む483bpのフラグメントを増幅する。別のプライマーとしては、5' -TTACAGGTAAGCCCTCCA ATGACC-3' と、5' -GCAAAGCTACCATTTAGGAACC C-3' とを使用して、第22番染色体中の検出可能な遺伝子を有しない領域に位置している (Bouchard, C. et al. (2001) Genes & Dev 15, 2042-2047) E-ボックスにおけるゲノミック配列を増幅する。

このE-ボックスは検出可能な遺伝子を有しないクロモソーム中に位置している (Bouchard, C. et al. (2001) Genes & Dev 15, 2042-2047)。

【0032】

(抗体)

ヒト *mina 53* のLys 3からカルボキシル基末端までの部分は、市販のE. coli BL21 (DE3) (ノバジェン社製) 中でpET/h*mina 53* を用いて発現し、SDS-PAGEによって単離、精製した。この組換えポリペプチドでラビットを免疫した。GST融合タンパク質GST-M*ina 53* をE. coli JM109中でpGEX-h*mina 53* を用いて発現し、グルタチオン・セファロース (ファルマシア社製) によって単離した。組換えGST-M*ina 53* ポリペプチドを結合したセファロース4Bを用いてラビットの血清か

ら抗体を上記文献に従って精製した。1つの抗c-Myc抗体はすでに報告したものをを用いた。

その他の抗体は市販のものを使用した。抗c-Myc抗体(N262)(サンタクルス社製)、抗ヌクレオリンマウスモノクローナル抗体(C23)(サンタクルス社製)、ヤギ抗ラビットIgG-HRP抗体(サンタクルス社製)、アレクサ488結合抗マウスIgG(モレキュラー・プローブ社)、Cy3結合抗ラビットIgG(ザイメッド・ラボラトリーズ社製)。

【0033】

(ウェスタンブロット分析および間接免疫蛍光染色)

ウェスタンブロッティングは実質的には上記文献記載のとおりに行った(Tsunooka, M. et al. (1988) J. Biochem. 104, 560-564)。細胞をトリプシン処理し、100mMのトリス、pH6.8、0.1MのDTT、20%グリセロールを含む3%SDS溶液中に回収し、4~20%ポリアクリルアミド上で分離し、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)ミリポアメンブレン(ミリポア社製)に移行した。抗体で処理した後、シグナルをECL強化化学発光法(アマシャム・ファルマシア社製)を用いて検出した。

間接免疫蛍光法のために、6ウエルプレートのガラスカバースリップ上で生育したHeLa細胞を-20℃で10分間メタノール中で固定した。抗Mina53ラビット抗体と抗ヌクレオリンマウスモノクローナル抗体を添加し、37℃で120分間反応した。0.1%スキムミルクPBS懸濁液で3回洗浄した後、Alexa488結合抗マウスIgGならびにCy3結合抗ラビットIgGを添加し、37℃で120分間反応し、0.1%スキムミルクPBS懸濁液で3回洗浄した。最後に、細胞をイムノン(Immunon)(テルモ・シャンドン社製)中に埋設し、蛍光顕微鏡で観察した。

【0034】

(RNAの調製およびsiRNAの細胞中への導入)

21個のヌクレオチドからなるスモール・インターフェアリング(small interfering)RNA(siRNA)二本鎖が、HeLa細胞を含む哺乳動物の細胞株中で遺伝子発現を特異的に抑制するとの報告が最近なされ

た (Elbashir, S.M. et al. (2001) Nature 411, 494-498)。そこで、21個のヌクレオチドからなる siRNA であって、ヒト mina53 ならびにラット mina53 (19個のヌクレオチドのうち5個がヒト mina53 のそれとは異なる) に対して特異的な siRNA 二本鎖2重ラセンを常法にしたがって化学的に合成した。非特異的コントロールとして、ヒト mina53 siRNA とは逆方向配列を有する二本鎖も同様に合成した。ヒト Mina53 およびラット Mina53 を標的とする siRNA 配列は、開始コドンの第1ヌクレオチドに対して位置45-63を使用し、3'末端に2つのデオキシチミジンを付加している。siRNA をアニールし、実質的には文献記載の方法と同じ方法で細胞に導入した (Elbashir, S.M. et al. (2001) Nature 411, 494-498)。siRNA 導入の24時間前に、指数関数的生育期の細胞をトリプシン処理し、12ウエルプレートにプレートした。siRNA は1ウエルあたり siRNA 200 pmol と、市販のオリゴフェクタミン (Oligofectamine) (ライフテクノロジー社) とを用いて細胞に導入した。ただし、HeLa細胞は、無血清培地では20時間以上培養し、3Y1My c B細胞では同様に10時間培養し、siRNA を導入した。

【0035】

(結果)

上記実施例では、c-My c 活性を条件付に活性化するために、エストロゲン誘発性 My c システムを使用した (Eilers, M., et al. (1989) Nature 340, 66-68)。キメラタンパク質 c-My c ER は、ヒト c-My c と、ヒトエストロゲンレセプターのエストロゲン結合ドメインとから構成されている。c-My c ER は、エストロゲンの非存在下で細胞骨格成分に結合している。エストロゲンもしくはその誘導体 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) がキメラタンパク質に結合したとき、細胞骨格から遊離して c-My c として機能する。ヒト膠芽腫細胞株 T98G を異所性 c-My c 活性を導入する親細胞として使用した。c-My c ER タンパク質 (T98Gmy cer-2) を発現する T98G 細胞株を確立した。

指数関数的に増殖する状態にある細胞を、OHT の存在下もしくは非存在下で

20時間培養し、全RNAを単離し、上記に記載したcDNAマイクロアレイ分析に付した。すでに報告されているMy c 標的遺伝子、つまり、ODCと、ヌクレオリン (nucleolin) の特定のシグナルは、c-My c ERの活性に伴って、それぞれ2.6倍と1.6倍増加した。これらの結果は、My c 標的遺伝子がこれらの実験システムにより検出され得ることを示している。

【0036】

上記実施例において、c-My cの機能を調べるために、c-My c ER活性化によって刺激され発現上昇した遺伝子のうちでヒト発現配列タグ (EST) 配列について調べた。その結果、ESTクローンW27666に対するシグナルがc-My c 活性によって1.9倍程刺激され発現上昇することが分かった。この上昇率は、c-My c 標的遺伝子であるODCとヌクレオリンについてここで測定した値と類似していた。

W27666の5' - 上流部をコードするcDNA分子を、ヒト赤血球腫瘍白血病細胞 (Human Erythroid Leukemia: HEL) ライブラリーから5' - RACEプロトコルを用いて単離した。5' - 末端の配列が異なる2種のcDNAを単離した。5' - RACE実験からのヌクレオチド配列とESTクローンW27666のそれに一致するヌクレオチド配列を有するESTとを用いて、mRNA分子の全配列を予測した。予測分子の5' - 末端の配列と3' - 末端の配列とに一致するプライマーを使用して、2.3 kb 長cDNAをRT-PCRプロトコルによって増幅した。増幅したcDNAはベクターにクローン化し配列を決定した。得られたcDNAの大部分は、52800.28 Daの予測分子量を有する465個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている (配列表の配列番号1)。このタンパク質の細胞内での局在を、特異的な抗体で間接免疫蛍光染色することによって可視化したところ、このタンパク質は核中に局在していることが判明した。その結果、この遺伝子とタンパク質をそれぞれmina53とMina53 (つまり、分子量53 kDaを有するmy c - induced nuclear antigen) と命名した。

大きな固まり状の染色が核中に検出された。抗ヌクレオリン抗体による二重染色では、これらの点が核小体と一致していることが示された。GFP融合min

a 53 タンパク質を細胞に発現したときにも、この融合タンパク質が核ならびに核小体に蓄積されることが観察された。これらの結果は、Mina 53 が核質ならびに核小体に非常に存在局在している核タンパク質であることを示している。

【0037】

464 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする cDNA (52672.15 Da の予測分子量を有する) もクローン化した。このタンパク質には主タンパク質の 297 Q が欠失している。又 101 bp が mina 53 cDNA の中央部に挿入された cDNA も検出された。挿入配列中に停止コドンがあり、この cDNA は Mina 53 タンパク質の 1-262 個のアミノ酸と、18 個の新規なアミノ酸とをコードしている。この mRNA の量は少ないけれども、この mRNA 分子は、ヒト赤白血病細胞株 (HEL)、卵巣ムチン様嚢胞腺癌細胞株 (MCAS)、ならびに結腸腺癌細胞株 (WiDr) から作成した cDNA ライブラリ中に検出された。

【0038】

Mina 53 がヒト、ラット、マウスに保存されていることについて調べた。その結果、mina 53 のオルソローガス遺伝子であると思われるマウス cDNA が Blast サーチ (GenBank Acc: NM_025910) によって見出された。この配列を基にして RT-PCR プロトコルによってマウス mina 53 cDNA を単離した。この配列は (GenBank Acc: NM_025910) のものとは塩基配列が異なっており、アミノ酸配列も 2 つ異なっていた (配列表の配列番号 2)。300 bp 長を有し、マウスとヒトの mina 53 の 3' - 非翻訳領域に相同するラット EST (GenBank Acc: H32933) もまた見出された。ラット mina 53 mRNA を増幅すると予測されたプライマーを使用することによって、RT-PCR プロトコルによってラット mina 53 cDNA を単離した (配列表の配列番号 3)。ラットならびにマウス mina 53 のオープンリーディングフレーム (ORF) は 465 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。ラットならびにマウス mina 53 タンパク質のアミノ酸配列は 86% が互いに一致していて、ヒトならびにマウス Mina 53 タンパク質のそれは 72% が一致していて、ヒトならびにラット Mina

53のそれは75%一致していた。このことはmina53が哺乳動物に保存されていることを示している。メチオニン開始コドンの3bp上流のヌクレオチドは、3種全てのmina53中の“A”であり、コザック・コンセンサス配列に一致している。ラットmina53遺伝子やマウスmina53遺伝子もヒトmina53遺伝子と同様に細胞増殖のメカニズム解明に役立ち、がん細胞の診断法などの研究にも有用である。

【0039】

本実施例でmina53 mRNAの発現について調べた。mina53 mRNAの発現についてノーザンブロット分析によって調べた。図2にmina53 mRNAの発現の状況を示す。

図2Aは、mina53 mRNAの発現レベルがT98G細胞中のc-myc発現レベルと関連していることを示している。血清飢餓状態のT98G細胞を最終濃度が10%にしたなるように血清を添加して刺激した。RNAを所定の時間に単離し、同量のRNAをノーザンブロット法によって分析してmina53とc-myc mRNAとを検出した（図2Aの左側の泳動図）。電気泳動した28Sと18SリボソームRNAを電気泳動した図はを加えたRNAがほぼ同じ量であることを示している。検出されたmRNAを定量し、プロットした（図2Aの右側のグラフ）。これらの結果からmina53 mRNAの発現が5倍増加したことが示された。この増加は血清添加後6時間して検出できるようになり、12時間後に最大になった。c-myc mRNA発現量は血清添加後3時間して検出できるようになり、12時間して最大となった。これらの結果は、c-myc mRNAの発現上昇に引き続き、mina53 mRNAの発現上昇が起こることを示唆している。

【0040】

図2Bは、ヒト前骨髄性白血病細胞HL60においてmina53 mRNAの発現レベルの低下とc-myc mRNAの消滅とが平行的な関係があることを示している。HL60細胞とをホルボール12-ミリステート13-アセテート（TPA）によって分化させると、c-mycの発現レベルが減少する。この実験系を使用して、Myc標的遺伝子が、血球細胞分化を伴うMycの発現低下に影

響されるかどうかを調べた。この実験では、ヒト前骨髄性白血病細胞HL60をTPA10nMに接触させて所定の時点でRNAを単離し、同量のRNAをノーザンブロット分析によって分析して、*mina53*と、*c-myc*と、CD18 mRNAとを検出した(図2Bの左側の泳動図)。さらにそれぞれのmRNAを定量し、プロットした(図2Bの右側のグラフ)。

その結果、HL60細胞をTPA10nMで培養後9時間して、分化マーカーCD18の発現が増加し始めて、誘発発現量が24時間目に3倍になったことが観察され、この系中で分化が確認された。TPA添加3時間後、*c-myc* mRNAレベルが低下し始めて、7時間後に5分の1になった。*c-myc* mRNAの低下はに引き続いて、*mina53* mRNAの低下につながりがおこり、*mina53* mRNAレベルが12時間後に5分の1になった。これらの実験から、*mina53*の発現パターンが*c-myc*の発現と因果関係があることが示されている。

【0041】

次に、*c-Myc*活性化の*mina53*に対する効果を調べた。図2Cには*c-Myc* ERタンパク質を発現するT98G細胞(T98Gmycer-2細胞)における*mina53* mRNAの誘発の状態を示している。ここでは、T98Gmycer-2細胞と親T98G細胞とを0.25%血清添加培地で40分間40時間培養した後、OHT200nMで処理し、RNAを所定の時間に単離した。図中、符号+はOHT添加20分前にシクロヘキシミド(CHX)20 μ g/mlを添加したことを示している。同量のRNAをノーザンブロット法によって分析して*mina53* mRNAを検出した(図2Cの左側の泳動図)。検出されたmRNAを定量し、プロットした(図2Cの右側のグラフ)。

図2Cに示すように、OHT処理T98Gmycer-2細胞中では、*mina53* mRNAレベルは9時間一定して上昇し、誘発発現量がほとんど3倍ほど増加した。T98G親細胞をOHTで処理しても*mina53* mRNAレベルを刺激は上昇しなかった。OHTによるT98Gmycer-2細胞中での*mina53* mRNAの誘発発現誘導はタンパク質合成インヒビターであるシクロヘキシミドの存在下でも維持された。シクロヘキシミドで処理してもT98G親細胞

中で *mina 53* mRNA レベルに対する効果がほとんど無かった。これらの結果は、*mina 53* 遺伝子が *Myc* の直接の標的であることを示している。

【0042】

Myc の活性化によって *Mina 53* タンパク質の発現誘導を図3を参照して説明する。図3は特異的な抗体を使用した *Mina 53* タンパク質のウェスタンブロッティング分析を示す図である。

まず、図3Aを参照して、*Myc* の活性化により *Mina 53* タンパク質の発現上昇を説明する。T98GおよびT98Gmycer-2細胞をOHT200nMの存在下もしくは非存在下で20時間培養した。ヒト *Mina 53* タンパク質に対する特定の特異的な抗体を使用したウェスタンブロッティングにより *Mina 53* タンパク質を分析した（左側パネル）。HL60細胞を、TPA10nMの存在下もしくは非存在下で20時間培養して、ヒト *Mina 53* タンパク質に対する特異的な抗体と、抗c-Myc抗体に対する特異的な抗体とを使用したウェスタンブロッティングによりTPA10nMの存在下もしくは非存在下で20時間培養した（右側パネル）。タンパク質の染色に対するのプロファイルも示した（下側パネル）。

かかる特定の特異的な抗体を使用したウェスタンブロッティングによって、アミノ酸配列から予測されたのと同じ移動度を有するバンドをT98G細胞とHL60細胞中に検出した（図3A）。*Mina 53* のバンドの強度は、c-MycERがT98Gmycer-2細胞中でOHTによって活性化されたときに増加した。HL60細胞をTPA10nMのを用いて存在下で20時間培養した後、c-Mycと *Mina 53* タンパク質の発現とが減少した。

【0043】

図3Bに示すように、ヒトc-Mycと、その活性化ドメイン（TAD）の大部分を欠失している変異c-Mycをコードする発現ベクターと、空のベクターとをラット3Y1繊維芽細胞中に導入して安定して発現する細胞株を確立した。3Y1MycAと3Y1MycBとは野生型ヒトc-Mycを保持発現していて、3Y1Myc(dTAD)Aと3Y1Myc(dTAD)BとはTAD欠失c-Mycを保持発現していて、3Y1ベクターは空のベクターを保持している。

抗Mina53抗体（上側パネル）と抗c-Myc抗体（中間パネル）とを使用してウェスタンブロッティングによってタンパク質を分析した。通常の染色法によるタンパク質のプロファイルも示した（下側パネル）。

Mina53の発現のMycによる制御は、ラット繊維芽細胞株3Y1中で確認された（図3B）。ヒトc-Mycを3Y1細胞に安定して導入したとき、Mina53の発現はc-Mycの発現の用量依存的に増加した（3Y1、3Y1ベクター、3Y1MycA、3Y1MycBに対するのレーンとを比較）。また、転写活性化ドメイン（TAD）が欠失しているc-Myc突然変異体を3Y1細胞に導入した。Myc突然変異体が野生型c-Mycの発現に匹敵するレベルで発現してもたときは（3Y1MycA、3Y1Myc（dTAD）Aと比較）、Mina53の発現は増加しなかった。Myc突然変異体が野生型c-Mycの発現と同様のより遥かに高いレベルで発現しても（3Y1ベクター、3Y1MycB、3Y1Myc（dTAD）Bのレーンをと比較）、Mina53の発現は増加しなかった。これらの結果から、c-Mycがmina53の発現をc-Mycの転写活性化ドメイン（TAD）を使って、活性化することを示している。

【0044】

図1Aは、ヒトmina53遺伝子の構造の概略を示している。図中、ボックスはエクソンを示し、閉鎖部はオープンリーディングフレーム（ORF）を示し、開放部は5' 未翻訳領域と3' 未翻訳領域を示す。ヒトmina53遺伝子は12個のエクソンから構成されていて、2個の転写開始部位としてエクソン1aと1bが存在する。転写方向は左側から右側であり、転写はエクソン1aまたはエクソン1bから開始する。エクソン1bは、エクソン1aの0.25kb下流に存在する。翻訳開始部位はエクソン2に存在する。停止コドン（TAG）はエクソン10に存在する。464個のアミノ酸（297Qを欠失している）をコードするcDNAはエクソン7の最初の3bpが欠失している。エクソン5とエクソン6との間に存在するエクソン5' は、主cDNAの中央部に挿入された101bpの配列をコードしている。

mina53 cDNA配列を含むヒトゲノミックDNA配列はHTGS（Ge

nBankAcc: AC026100, AC073245, AC024892) 中に見出した。イントロン2 (エクソン2とエクソン3との間) の長さはGenBankのデータと異なっていたので、エクソン2とエクソン3中の配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRで増幅し、その長さを5.2kbであることを決定した。UCSCGenomeBrowserのマッピングデータは、mina53遺伝子が第3番染色体(3q12.1)にマップされていることを示している。

【0045】

図1Bは、エクソン1bが2個のE-ボックス(CACGTGエレメント)を有していることを示している。これら2個のE-ボックスの1番目と2番目とをそれぞれE-ボックス1とE-ボックス2と命名した。

mina53遺伝子のプロモータ活性を調べるために、エクソン1aから上流の領域と、エクソン1aと、エクソン1bと、イントロン1の1部とを含むhitmina53ゲノミックDNAフラグメントをファイアーフライ・ルシフェラーズ(firefly luciferase) cDNAに結合して、レポータープラスミド、pMina(W)luciを構築した(図1B)。図中、pMina(dE)luciは2つのE-ボックスを持つ部分を欠損させたレポータープラスミドを、pMina(mE1/2)luciは2個のE-ボックスをに変異を導入したレポータープラスミドを、pMina(mE1)luciはE-ボックス1にに変異を導入したレポータープラスミドを、pMina(mE2)luciはE-ボックス2にに変異を導入したレポータープラスミドを示している。

【0046】

図1Cは、T98G細胞中でのトランジェント発現アッセイによって、DNAフラグメントがプロモータ活性を有していることを示している。

c-MycERをOHTによって活性化すると、ルシフェラーズ活性は3倍まで増加した。この刺激は、mina53 mRNAに対して観察されたものに匹敵している(図2C)。

pMina(W)luciから2個のE-ボックスを除去したときに、ルシフェラーズ活性はc-MycERキメラタンパク質(図2C、pMina(W)l

uciのデータ)を活性化もしても増加しなかった。その2個のE-ボックスをCACGTGからCACCTGに変異したpMina (mE1/2) luciからの発現はもc-My cの活性化によっても増加しなかった。これらの結果は、pMina (W) luciの発現がCACGTGエレメントによって刺激E-ボックスを介して活性化されることを示している。

どちらのE-ボックスCACGTGエレメントが機能的であるかを決定するために、それぞれのE-ボックスの配列をCACGTGからCACCTGに変異したさせた異なるCACGTGエレメントを有するレポータープラスミドpMina (mE1) luciとpMina (mE2) luciとを構築した(図1B)。図1Cに示すように、E-ボックス1の変異による効果はほとんど無かった。他方、E-ボックス2を変異した場合、c-My cによる刺激は著しく低下した。これらの結果は、c-My cがE-ボックス2を介して機能していることを示している。

【0047】

HL60細胞が増殖応答している間c-My cタンパク質がインビボ (i n v i v o) で内因性mina53遺伝子に結合することを調べるために、文献記載の方法によってクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行なった (Boyd, K.E. et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2529-2537; Boyd, K. E. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13887-13892)。抗c-My c抗体で免疫沈降後、各サンプル中の内因性mina53遺伝子フラグメントをPCRでモニターし、mina53遺伝子中のエクソン1bとイントロン1の部分を特異的に増幅した。

図4に示すように、2個の異なる抗c-My c抗体は、増殖期のHL60細胞からmina53遺伝子を免疫沈降したが、TPAと共に培養すると、HL60からはmina53遺伝子断片が免疫沈降されなかった。mina53ゲノミックDNAフラグメントの精製検出は、非特異的抗体がmina53DNAフラグメントを免疫沈降しなかったので、mina53遺伝子に結合するc-My cに依存している。その上、染色体22中のいずれの検出可能遺伝子もない染色体領域に位置しているE-ボックス近傍のゲノム断片をc-My cに対する抗体が沈

降しなかったため、*mina 53* 遺伝子で検出された結合は特異的である。これらの結果は、HL 6 0 細胞中で *mina 53* 遺伝子に増殖期に特異的に *c-Myc* が結合していることを示している。

【0048】

Mina 53 が HeLa 細胞と *c-Myc* を著しく発現する 3 Y 1 細胞との増殖に関与していることを図 5 を参照して説明する。

mina 53 の生物学的機能を調べるために、上述したように、*siRNA* 二本鎖を使用して *Mina 53* タンパク質の発現を特異的に阻害した。*siRNA* の導入後 4 0 時間経過後 *Mina 53* タンパク質をモニターした。

図 5 A で示すように、*Mina 53* タンパク質の発現はヒト細胞株である HeLa 細胞中でヒト *mina 53* 特異的 *siRNA* 二本鎖によって特異的に減少した。これに対して、非特異的 *siRNA*、つまり、*mina 53* の逆方向配列を有する二本鎖（コントロール）と、ラット *mina 53* 特異的二本鎖においては、*Mina 53* タンパク質の発現は減少しなかった。*Mina 53* タンパク質の発現は、*c-Myc* を著しく発現するラット 3 Y 1 細胞（3 Y 1 Myc B）中でラット *mina 53* 特異的 *siRNA* 二本鎖によって特異的に減少するが、コントロール *siRNA* とヒト *mina 53* 特異的二本鎖においては減少しない。

図 5 B に示すように、*Mina 53* の発現が減少したときには、細胞増殖は非常に抑制される。つまり、HeLa 細胞と 3 Y 1 Myc B 細胞の増殖はヒトならびにラット *Mina 53* それぞれに特異的な *siRNA* 二本鎖の導入によってほとんど完全に停止する。

【0049】

【考察】

上述したように、この発明によって、*c-Myc* が *mina 53* の発現を直接調節していることは明らかである。血清飢餓状態におかれた T 9 8 G 細胞が血清で活性化されたとき、*c-myc* mRNA のレベルが上昇し、その後 *mina 53* の上昇が続いて発生する。HL 6 0 細胞中で TPA による *c-myc* の発現の低下は *mina 53* mRNA ならびにタンパク質の発現を低下させる。ラット繊維芽細胞株 3 Y 1 中で、転写活性化ドメインを欠損した変異型 *c-Myc* ではな

く、野生型 *c-Myc* の高発現は、*mina53* の発現を上昇する。*c-Myc* タンパク質が *c-Myc* ER キメラタンパク質中で活性化されたときに、*mina53* mRNA とタンパク質の発現が活性化される。*c-Myc* ER の活性化による *mina53* mRNA の誘導はタンパク質合成インヒビターであるシクロヘキサミドの存在下でも維持される。ヒト *mina53* ゲノミック DNA フラグメントから構築されたレポータープラスミドからの発現はトランジェント発現実験において *c-Myc* ER の活性化によって上昇した。レポータープラスミド中の予測 *Myc* 結合部位 (E-ボックス 1: CACGTG エlement) が破壊されたとき、*c-myc* によるレポーター遺伝子の発現の刺激上昇もは起こらない。一方の CACGTG エlement (E-ボックス 1) の突然変異がほとんど効果を有しないのに対して、他方の CACGTG エlement (E-ボックス 2) の突然変異は *c-Myc* によるプロモーター活性上昇を著しく低下させ、*c-Myc* が特異的な CACGTG エlement を介して *mina53* の発現を活性化させることを示唆した。*c-Myc* タンパク質は、増殖期の HL60 においてインビボで *mina53* 遺伝子の上記 CACGTG エlement が存在する *mina53* ゲノミック DNA に結合する。ただし、TPA によって処理された HL60 細胞では、*c-Myc* タンパク質は *mina53* ゲノミック DNA に結合しない。これらの結果は *c-Myc* が *mina53* の発現を直接誘発することを示している。

【0050】

また、この発明に係る新規遺伝子 *mina53* は細胞増殖の調節を行うことができる。

ヒトと嚙歯動物との間に *Mina53* のアミノ酸配列が高率に保存されていることは、このタンパク質が哺乳動物において重要な役割を果たしていることを示唆している。*mina53* の発現は細胞増殖と深く関係していて、細胞増殖に対する *mina53* の役割を示している。*Mina53* の生物学的機能を調べるために、新しい手法、つまりスモール・インターフェアランス RNA (*siRNA*) 手法を、*mina53* の発現を特異的に阻止するために適用した。ヒトならびにラットの細胞中で *Mina53* タンパク質の発現がヒトならびにラット *mina53* 各々に特異的な *siRNA* 二本鎖によってだけ特異的に減少するので、特

異的な阻害が明白に示された。他方、Mina53タンパク質の発現は、コントロールsiRNA（ヒトmina53に対する反転配列）または使用した細胞とは異なる動物のmina53に対する二本鎖では、特異的に減少しなかった。Mina53タンパク質の発現が減少したとき、細胞増殖が著しく阻害されることが、ヒトならびにラットの細胞において観察された。これらの結果は哺乳動物の細胞増殖におけるmina53の重要性を示している。

【0051】

マウスにおけるインビボでのc-mycの役割が、c-mycの発現を段階的にゼロまで低下させたマウスを使用した研究によって、c-Mycレベルの低下が、多臓器形成不全（細胞数を減少する）による体重低下につながることを示された。Myc活性は、マウスにおける細胞周期を再度始める活性化T細胞の割合と、繊維芽細胞の細胞分裂の割合を決定する。最近のタイムラプス（time-lapse）顕微鏡によるインビボでの研究によっても、mycは細胞分裂を調節して、細胞周期に入るかもしくは細胞周期から出るかを調節している。これらの結果と一致して、細胞周期の進行に直接関与しているいくつかの遺伝子がmyc標的遺伝子として同定されている。これらのmyc標的遺伝子としては、例えば、サイクリンD1、サイクリンD2、Id2などが挙げられる。これらの遺伝子の一つを欠失したマウスはc-mycを欠失したマウスと比較してより緩やかな結果を示した。機能を持つc-myc遺伝子を完全に欠損した細胞に、発現遺伝子ライブラリーを導入し、正常な増殖を再確立する遺伝子を同定する試みは、c-mycならびにN-mycを繰り返して同定するだけの結果に終わった。これらの結果は、mycが単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子を制御して細胞周期を調節していることを示唆している。この発明によるデータでは、mina53がc-mycの標的遺伝子の一つであり得て、細胞増殖を調節していることを示している。したがって、Mina53タンパク質は、サイクリンD1、サイクリンD2、Id2などのように細胞周期調節因子と直接相互作用することにより機能している可能性が考えられる。最近の研究では、核小体は真核生物細胞周期の調節に関与しているある種のタンパク質にとっては監獄の様なものとして機能していることが示唆されている。核小体中への封鎖封入はタンパク質が細胞の別

の領域でその標的に到達することを防止しているようである。

Mina53 タンパク質は核に存在し、そのなかでも核小体中に集中している。核小体中にMina53が局在していることはMina53 タンパク質の活性調節の1つの様態を示しているのかもしれない。

【0052】

しょうじょうバエ (*Drosophila*) Myc (dMyc) の欠失が細胞生育 (細胞質量の蓄積) を低下し、細胞サイズを縮小するのに対し、dMycの過剰産生が生育割合ならびに細胞サイズを増加することが示されている。このことは、dMycが細胞生育に関与する遺伝子を調節することを示唆している。Mycの発現が増加し細胞サイズが大きくなることは哺乳類においても観察されている。例えば、免疫グロブリン重鎖エンハンサーのコントロール下でc-mycを発現するトランスジェニックマウスでは、Bリンパ球細胞の発達の全ての段階において正常なBリンパ球の細胞サイズを増加させる。この増加はタンパク質合成の増加と関連している。リボソーム生合成は細胞増殖にとって必須であり、また核小体は、1960年代から「リボソームファクトリー」であるといわれている。最近の報告では、mycが、リボソーム生合成の機能を有する大きなセット多数の遺伝子の発現を促進することが示唆されていることもあわせて考えると、Mina53が核小体中に局在しているという結果は、mina53がリボソーム生合成において必須の役割を果たしている可能性を示唆している。

【0053】

また、核小体がある種のmRNAの加工もしくは核外への移送、シグナル認識粒子RNAやテロメレースRNAの生合成、スプライセオソームの小さな核RNAの1種の加工などを含む多くの他の側面に関与していることが示されている。これらの機能はまた細胞増殖にとって必須であると思われる。したがって、Mina53はこれらの機能の一つに対して役割を果たすのかも知れない。

【0054】

その機能が実験的に示された既知のドメインはMina53において見出されていない。しかし、Mina53のアミノ酸配列128-271番は、配列類似性に基づいて最近同定されたドメイン、JmjC、のアミノ酸配列に良く整合し

ている。JmJCドメインはクッピンフォールドと呼ばれる構造を有する金属含有酵素に見られる。このドメインはDNA—もしくはクロマチン—結合ドメインと一緒にしばしば見出されることから、JmJCドメイン含有タンパク質はクロマチンの構築を調節する酵素ではないかと創造さ考えられている。このドメインにおけるヒト、ラット、マウスのMina53の87%が同じであり、全体の配列では72%~75%が同一である。このことはこのドメインの機能的重要性を示唆している。したがって、Mina53はクロマチン再構築を調節し、種々の遺伝子発現のパターンに著しく影響を及ぼす可能性が考えられる。

以上のことから、mina53と細胞増殖との関係が明らかであることから、mina53はmycの重要な標的であると考えられる。

【0055】

【発明の効果】

この発明にしたがって、cDNAマイクロアレイ手法を使用して、c-Mycによって調節される新規な遺伝子mina53を同定した。この結果、上述したように、この発明に係る新規な遺伝子mina53は、がん遺伝子mycによって直接発現調節されていること、核に存在する分子量5万3千のタンパク質Mina53をコードしていること、細胞増殖に関連していること、がん組織において特異的に発現が上昇していること、などによってがん関連分野において種々の応用が可能である。つまり、この発明に係る新規な遺伝子mina53は、がん細胞において特異的に発現が上昇することからがんの診断に応用が可能である。また、がん細胞の増殖抑制がMina53タンパク質の発現を抑制することにより観察されることから、遺伝子治療などによりmina53遺伝子の発現を抑制したり、またはMina53活性を特異的に抑制することができる新薬の開発にも応用できることになる。

【0056】

また、上記したように、この発明に係る抗Mina53抗体は、大腸がん、肉腫、舌がん、脳腫瘍などのがん細胞を良く染色することができることから、この発明のMina53はがんの診断に利用する可能性がある。また、Mina53タンパク質の発現を抑制すると、細胞増殖を強く抑制することができることから

、Mina53 活性を抑えるることによってがん治療への応用も可能である。

【0057】

更に、この発明に係るmina53 遺伝子ならびにその産物は、がん細胞などの正常でない細胞の診断およびかかる細胞の増殖を制御することも可能である。

Mina53 タンパク質やMina53 をコードするmRNA を組織中で検出し、がん細胞などの正常でない細胞を検出して診断に利用することができる。このような場合には、特異的抗体、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのMina53 タンパク質に結合する物質や、mina53 遺伝子を含む配列を有するRNA、DNA などを利用することができる。

【0058】

この発明においては、組織片に含まれるMina53 の発現量を、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのMina53 タンパク質に結合する物質を利用して、ELISA 法、ウェスタンブロット法もしくは関連手法によって測定することにより、細胞の状態を測定することもできる。mina53 遺伝子を含む配列を有するRNA、DNA などを利用しても、ノーザンブロッティング法、RNase プロテクション法、RT-PCR 法、cDNA マイクロアレイ法などの各種測定法によって細胞の状態を診断することもできる。また、この発明においては、血中、尿中などのMina53 タンパク質の量を測定することによって、がん細胞を診断することもできる。

【0059】

その上、Mina53 タンパク質に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの抗体は、ELISA 法やその関連手法により体内に存在するがん細胞などの正常状態にない細胞の存在の有無やその量を推定もしくは測定して診断を下すことも可能である。

【0060】

この発明では、上述したように、がん細胞などの正常状態にない細胞の増殖を制御することも可能である。Mina53 活性を抑制するためには、RNAi (small RNA interference RNA) 法、アンチセンス核酸法、プロモーターの相同配列の核酸導入法、プロモーターのデコイ法、リボザイ

ム法などを利用することができる。M i n a 5 3 に結合する物資（例えば、抗体などのタンパク質やより低分子の化合物など）も利用することができる。また、M i n a 5 3 のタンパク質や核酸配列に利用しうる物質、例えば、特異的抗体や m i n a 5 3 発現を抑制する s i R N A などや、上記物質を選択するためのスクリーニングなどの方法も利用することができる。

【 0 0 6 1 】

【配列表】

Sequence Listing

<100> Kurume University School of Medicine

<120> Gene mina53 involved in cancer and Protein Mina53

<130>

<160> 3

<210> 1

<211> 464

<212> DNA

<213> homo sapiens sapiens

<400>1

atg cca aag aaa gca aag cct aca ggg agt ggg aag gaa gag ggg ccg gct ccc
Met Pro Lys Lys Ala Lys Pro Thr Gly Ser Gly Lys Glu Glu Gly Pro Ala Pro
5 10 15

tgt aag cag atg aag tta gaa gca gct ggg ggg cct tca gct tta aac ttt gac

Cys Lys Gln Met Lys leu Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Ala Leu Asn Phe Asp
 20 25 30 35

agt ccc agt agt ctc ttt gaa agt tta atc tcg ccc atc aag aca gag act ttt
 Ser Pro Ser Ser Leu Phe Glu Ser Leu Ile Ser Pro Ile Lys Thr Glu Thr Phe
 40 45 50

ttc aag gaa ttc tgg gag cag aag ccc ctt ctc att cag aga gat gac cct gca
 Phe Lys Glu Phe Trp Glu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Gln Arg Asp Asp Pro Ala
 55 60 65 70

ctg gcc aca tac tat ggg tcc ctg ttc aag cta aca gat ctg aag agt ctg tgc
 Leu Ala Thr Tyr Tyr Gly Ser Leu Phe Lys Leu Thr Asp Leu Lys Ser Leu Cys
 75 80 85 90

agc cgg ggg atg tac tat gga aga gat gtg aat gtc tgc cgg tgt gtc aat ggg
 Ser Arg Gly Met Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asn Val Cys Arg Cys Val Asn Gly
 95 100 105

aag aag aag gtt tta aat aaa gat ggc aaa gca cac ttt ctt cag ctg aga aaa
 Lys Lys Lys Val Leu Asn Lys Asp Gly Lys Ala His Phe Leu Gln Leu Arg Lys
 110 115 120 125

gat ttt gat cag aaa agg gca acg att cag ttt cac caa cct cag aga ttt aag
 Asp Phe Asp Gln Lys Arg Ala Thr Ile Gln Phe His Gln Pro Gln Arg Phe Lys
 130 135 140

gat gag ctt tgg agg atc cag gag aag ctg gaa tgt tac ttt ggc tcc ttg gtt
 Asp Glu Leu Trp Arg Ile Gln Glu Lys Leu Glu Cys Tyr Phe Gly Ser Leu Val
 145 150 155 160

ggc tcg aat gtg tac ata act ccc gca gga tct cag ggc ctg ccg ccc cat tat
 Gly Ser Asn Val Tyr Ile Thr Pro Ala Gly Ser Gln Gly Leu Pro Pro His Tyr
 165 170 175 180

gat gat gtc gag gtt ttc atc ctg cag ctg gag gga gag aaa cac tgg cgc ctc
 Asp Asp Val Glu Val Phe Ile Leu Gln Leu Glu Gly Glu Lys His Trp Arg Leu
 185 190 195

tac cac ccc act gtg ccc ctg gca cga gag tac agc gtg gag gcc gag gaa agg
 Tyr His Pro Thr Val Pro Leu Ala Arg Glu Tyr Ser Val Glu Ala Glu Glu Arg
 200 205 210 215

atc ggc agg ccg gtg cat gag ttt atg ctg aag ccg ggt gat ttg ttg tac ttt
 Ile Gly Arg Pro Val His Glu Phe Met Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Tyr Phe
 220 225 230

ccc aga gga acc att cat caa gcg gac act cct gcg ggg ctg gcc cac tcg act
 Pro Arg Gly Thr Ile His Gln Ala Asp Thr Pro Ala Gly Leu Ala His Ser Thr
 235 240 245 250

cac gtg acc atc agc acc tac cag aac aat tca tgg gga gat ttc ctt ttg gat

His Val Thr Ile Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Ser Trp Gly Asp Phe Leu Leu Asp
 255 260 265 270

acc atc tcg ggg ctt gta ttt gat act gca aag gaa gac gtg gag tta cgg acc
 Thr Ile Ser Gly Leu Val Phe Asp Thr Ala Lys Glu Asp Val Glu Leu Arg Thr
 275 280 285

ggc ata ccc cgg cag ctg ctc ctg gtg gaa tcc aca act gtt gct aca aga cga
 Gly Ile Pro Arg Gln Leu Leu Leu Val Glu Ser Thr Thr Val Ala Thr Arg Arg
 290 295 300 305

tta agt ggc ttc ctg agg aca ctt gca gac cgg ctg gag ggc acc aaa gaa ctg
 Leu Ser Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ala Asp Arg Leu Glu Gly Thr Lys Glu Leu
 310 315 320

ctt tcc tca gac atg aag aag gat ttt att atg cac aga ctc ccc cct tac tct
 Leu Ser Ser Asp Met Lys Lys Asp Phe Ile Met His Arg Leu Pro Pro Tyr Ser
 325 330 335 340

gcg gga gat ggg gca gag ctg tca aca cca ggt gga aag tta ccg agg ctg gac
 Ala Gly Asp Gly Ala Glu Leu Ser Thr Pro Gly Gly Lys Leu Pro Arg Leu Asp
 345 350 355 360

agt gta gtg aga ctg cag ttt aaa gac cac att gtc ctc aca gta ctg ccg gat
 Ser Val Val Arg Leu Gln Phe Lys Asp His Ile Val Leu Thr Val Leu Pro Asp
 365 370 375

caa gat caa tct gat gaa gct caa gaa aag atg gtg tac atc tat cat tcc tta
 Gln Asp Gln Ser Asp Glu Ala Gln Glu Lys Met Val Tyr Ile Tyr His Ser Leu
 380 385 390 395

aag aat agt aga gag aca cac atg atg gga aat gag gag gaa aca gag ttt cat
 Lys Asn Ser Arg Glu Thr His Met Met Gly Asn Glu Glu Glu Thr Glu Phe His
 400 405 410

gga ctt cgc ttc cct ttg tca cat ttg gat gca ctg aag caa att tgg aat agt
 Gly Leu Arg Phe Pro Leu Ser His Leu Asp Ala Leu Lys Gln Ile Trp Asn Ser
 415 420 425 430

cca gct att tct gtc aag gac ctg aaa ctt act aca gat gag gaa aag gaa agc
 Pro Ala Ile Ser Val Lys Asp Leu Lys Leu Thr Thr Asp Glu Glu Lys Glu Ser
 435 440 445 450

ctg gta tta tcc ctc tgg aca gaa tgt tta att caa gta gtc tag
 Leu Val Leu Ser Leu Trp Thr Glu Cys Leu Ile Gln Val Val ***
 455 460 464

<210> 2
 <211> 465
 <212> DNA

<213> mus musculus

<400> 2

atg cca aag aaa gtg cag ccc aca ggg gat gag aac gaa gaa gag tct gtt cct
 Met Pro Lys Lys Val Gln Pro Thr Gly Asp Glu Asn Glu Glu Glu Ser Val Pro
 5 10 15

tgc aag cgg gtg aag gag gag ctg cct gaa acg ctt tct gta tta aac ttt gac
 Cys Lys Arg Val Lys Glu Glu Leu Pro Glu Thr Leu Ser Val Leu Asn Phe Asp
 20 25 30 35

agc ccc agt agt ttc ttc gaa agt tta atc tca ccc atc aaa gta gag act ttt
 Ser Pro Ser Ser Phe Phe Glu Ser Leu Ile Ser Pro Ile Lys Val Glu Thr Phe
 40 45 50

ttc aag gaa ttc tgg gaa caa aag ccc ctt ctc att cag agg gat gac cct gta
 Phe Lys Glu Phe Trp Glu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Gln Arg Asp Asp Pro Val
 55 60 65 70

ctg gcc aaa tat tac cag tct ctg ttc agc ctc tca gat ctg aag aga ctc tgc
 Leu Ala Lys Tyr Tyr Gln Ser Leu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Lys Arg Leu Cys
 75 80 85 90

aag aaa gga gtg tac tat gga aga gac gtg aat gtc tgc cgg agc atc agt ggg
 Lys Lys Gly Val Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asn Val Cys Arg Ser Ile Ser Gly
 95 100 105

aag aag aag gtt tta aat aag gat ggc aga gca cat ttt ctt cag ctg aga aaa
 Lys Lys Lys Val Leu Asn Lys Asp Gly Arg Ala His Phe Leu Gln Leu Arg Lys
 110 115 120 125

gat ttt gat cag aag agg gca aca att cag ttt cac caa cct cag aga tat aag
 Asp Phe Asp Gln Lys Arg Ala Thr Ile Gln Phe His Gln Pro Gln Arg Tyr Lys
 130 135 140

gat gag ctg tgg cgg atc cag gaa aag ctg gaa tgt tac ttt ggg tcc tta gta
 Asp Glu Leu Trp Arg Ile Gln Glu Lys Leu Glu Cys Tyr Phe Gly Ser Leu Val
 145 150 155 160

ggc tcg aat gtg tac atg act cct gca gga tct cag ggc ctc cct cca cat tat
 Gly Ser Asn Val Tyr Met Thr Pro Ala Gly Ser Gln Gly Leu Pro Pro His Tyr
 165 170 175 180

gat gat gtt gag gtt ttt atc ctg cag ctg gag gga acg aaa cac tgg cgc ctg
 Asp Asp Val Glu Val Phe Ile Leu Gln Leu Glu Gly Thr Lys His Trp Arg Leu
 185 190 195

tac tcc cca act gtg ccc ctg gca cac gag tac agt gtg gaa tct gag gac cgg
 Tyr Ser Pro Thr Val Pro Leu Ala His Glu Tyr Ser Val Glu Ser Glu Asp Arg
 200 205 210 215

atc ggc aca ccg aca cac gac ttc ctg ctg aag cct gga gat ttg ttg tac ttt
Ile Gly Thr Pro Thr His Asp Phe Leu Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Tyr Phe
220 225 230

ccc aga ggg acc att cat cag gca gaa act cct tca ggc ctg gcc tac tct att
Pro Arg Gly Thr Ile His Gln Ala Glu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Tyr Ser Ile
235 240 245 250

cac ctg act att agc acc tac cag aac aat tca tgg gga gac tgc ctt ttg gat
His Leu Thr Ile Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Ser Trp Gly Asp Cys Leu Leu Asp
255 260 265 270

tcc att tcg ggg ttc gta ttt gac att gca aag gaa gat gtg gca tta agg agt
Ser Ile Ser Gly Phe Val Phe Asp Ile Ala Lys Glu Asp Val Ala Leu Arg Ser
275 280 285

gga atg ccc cgg cgg atg ctc ctg aat gtg gaa acc cca gct gat gta aca agg
Gly Met Pro Arg Arg Met Leu Leu Asn Val Glu Thr Pro Ala Asp Val Thr Arg
290 295 300 305

aag ttg agt ggc ttt ctg agg act ctt gca gac cag ctc gag ggc aga gaa gag
Lys Leu Ser Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ala Asp Gln Leu Glu Gly Arg Glu Glu
310 315 320

ctg ctg tca tca gat atg aag aag gac ttc gtc aag cac aga ctc cct cct ttc
Leu Leu Ser Ser Asp Met Lys Lys Asp Phe Val Lys His Arg Leu Pro Pro Phe
325 330 335 340

ttc gag gga aat gga acg gag acg atg gac cca ggt aaa cag ttg cca agg ttg
Phe Glu Gly Asn Gly Thr Glu Thr Met Asp Pro Gly Lys Gln Leu Pro Arg Leu
345 350 355 360

gac aac ata ata aga ctg cag ttc aaa gat cac att gtc ctc aca gta ggg cca
Asp Asn Ile Ile Arg Leu Gln Phe Lys Asp His Ile Val Leu Thr Val Gly Pro
365 370 375

gat aag aat cca ttt gat gaa gct caa caa aag gtg gtt tac atc tat cat tct
Asp Lys Asn Pro Phe Asp Glu Ala Gln Gln Lys Val Val Tyr Ile Tyr His Ser
380 385 390 395

ctg aag aat gtg agg cag atg cac atg ata gga gaa gag gag gaa tcc gag att
Leu Lys Asn Val Arg Gln Met His Met Ile Gly Glu Glu Glu Glu Ser Glu Ile
400 405 410

ttc ggt ctt cgc ttt cct tta tca cat gtg gat gct ctg aag caa atc tgg tgc
Phe Gly Leu Arg Phe Pro Leu Ser His Val Asp Ala Leu Lys Gln Ile Trp Cys
415 420 425 430

ggg tca cca att cgt gtt aag gaa ctg aaa ctt gac aca gat gaa gaa aag gag
Gly Ser Pro Ile Arg Val Lys Glu Leu Lys Leu Asp Thr Asp Glu Glu Lys Glu
435 440 445 450

aac ctg gca ctg tct ctc tgg tcg gag tot tta atc caa gta ctc tag
 Asn Leu Ala Leu Ser Leu Trp Ser Glu Ser Leu Ile Gln Val Leu ***
 455 460 465

<210> 3

<211> 475

<212> DNA

<213> rattus norvegicus

<400>3

atg cca aag aaa gtg aag ccc aca ggg gat gag aat gaa gaa gag tct gtt cct
 Met Pro Lys Lys Val Lys Pro Thr Gly Asp Glu Asn Glu Glu Glu Ser Val Pro
 5 10 15

tgc aag cag gtg aaa gag gag cta cct aat acg ctt tct gta tta aac ttt gac
 Cys Lys Gln Val Lys Glu Glu Leu Pro Asn Thr Leu Ser Val Leu Asn Phe Asp
 20 25 30 35

agc ccc agt agt ttc ttt gaa agt tta ata tca ccc atc aaa gta gag aca ttt
 Ser Pro Ser Ser Phe Phe Glu Ser Leu Ile Ser Pro Ile Lys Val Glu Thr Phe
 40 45 50

ttc aag gaa ttc tgg gaa cag aag ccc ctt ctc att cag aga gat gac cct tcg
 Phe Lys Glu Phe Trp Glu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Gln Arg Asp Asp Pro Ser
 55 60 65 70

ctg gcc gca tat tac cag tct ctg ttc agc ctc tca gat ctg agg agt ctc tgc
 Leu Ala Ala Tyr Tyr Gln Ser Leu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Arg Ser Leu Cys
 75 80 85 90

agc caa ggg ctg tac tat gga aga gat gtc aat gtc tgc cgg tgc atc ggt ggg
 Ser Gln Gly Leu Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asn Val Cys Arg Cys Ile Gly Gly
 95 100 105

aag aag aag gtt tta aat aag gat ggc aaa gca cag ttt ctt cag ctg aga aaa
 Lys Lys Lys Val Leu Asn Lys Asp Gly Lys Ala Gln Phe Leu Gln Leu Arg Lys
 110 115 120 125

gat ttt gat cag aag agg gca aca att cag ttt cat cag cca cag aga ttt aag
 Asp Phe Asp Gln Lys Arg Ala Thr Ile Gln Phe His Gln Pro Gln Arg Phe Lys
 130 135 140

gat gag ctc tgg agg atc cag gaa aag ctg gaa tgt tac ttt ggc tcc tta gta
 Asp Glu Leu Trp Arg Ile Gln Glu Lys Leu Glu Cys Tyr Phe Gly Ser Leu Val
 145 150 155 160

ggc tca aat gtg tac atg act ccc gca gga tct cag ggc ctt cct cca cat tac
 Gly Ser Asn Val Tyr Met Thr Pro Ala Gly Ser Gln Gly Leu Pro Pro His Tyr

165	170	175	180
gac gat gtt gag gtt ttt atc ctg cag ctg gag gga agg aaa cgt tgg cgc ctg			
Asp Asp Val Glu Val Phe Ile Leu Gln Leu Glu Gly Arg Lys Arg Trp Arg Leu			
185	190	195	
tac tcc cca act gtg ccc ctg gcg cgt gag tac agt gtg gag cct gag gac cgg			
Tyr Ser Pro Thr Val Pro Leu Ala Arg Glu Tyr Ser Val Glu Pro Glu Asp Arg			
200	205	210	215
att ggc aca cca aca cat gac ttc ctg ctg aag cct ggc gat ttg ttg tac ttc			
Ile Gly Thr Pro Thr His Asp Phe Leu Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Tyr Phe			
220	225	230	
ccc aga ggg acc att cac cag gca gaa act cct tca ggc ctg gcc cac tct att			
Pro Arg Gly Thr Ile His Gln Ala Glu Thr Pro Ser Gly Leu Ala His Ser Ile			
235	240	245	250
cac ctg act att agc acc tac cag aac aat tca tgg gga gat tac ctt ttg gac			
His Leu Thr Ile Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Ser Trp Gly Asp Tyr Leu Leu Asp			
255	260	265	270
tcc att tcg ggg ctt gta ttt gac att gca aag gaa gat gtg gca tta agg act			
Ser Ile Ser Gly Leu Val Phe Asp Ile Ala Lys Glu Asp Val Ala Leu Arg Thr			
275	280	285	
gga atg ccc agg cgg atg ctc atg aat gtg gaa acc cca gct gac gta aca agg			
Gly Met Pro Arg Arg Met Leu Met Asn Val Glu Thr Pro Ala Asp Val Thr Arg			
290	295	300	305
aag ttg agt ggc ttt ctg agg act ctg gca gac cag ctc gag ggc aga aaa gaa			
Lys Leu Ser Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ala Asp Gln Leu Glu Gly Arg Lys Glu			
310	315	320	
ctg ctc tca tca gat atg aag aag gac ttc gtc atg cac aga ctt ccc cct ttc			
Leu Leu Ser Ser Asp Met Lys Lys Asp Phe Val Met His Arg Leu Pro Pro Phe			
325	330	335	340
tgt gtg gga aat gga aca gag tca atg aac cca ggt gga aag ttg cca agg ttg			
Cys Val Gly Asn Gly Thr Glu Ser Met Asn Pro Gly Gly Lys Leu Pro Arg Leu			
345	350	355	360
aac agc ata gta aga ctg cag ttt aaa gac cac att gtc ctc aca gta ggg ccc			
Asn Ser Ile Val Arg Leu Gln Phe Lys Asp His Ile Val Leu Thr Val Gly Pro			
365	370	375	
gat cag aat caa tct gat gaa gct caa caa aag gtg gtt tac atc tac cat tct			
Asp Gln Asn Gln Ser Asp Glu Ala Gln Gln Lys Val Val Tyr Ile Tyr His Ser			
380	385	390	395
cta aag aat gag aga cag acg cac atg atg ggg aaa gag gtg gaa aca gag att			
Leu Lys Asn Glu Arg Gln Thr His Met Met Gly Lys Glu Val Glu Thr Glu Ile			

400	405	410
tat gga ctt cgc ttt cct tta tcc tat gtg gac gct ctg aag caa atc tgg tgc		
Tyr Gly Leu Arg Phe Pro Leu Ser Tyr Val Asp Ala Leu Lys Gln Ile Trp Cys		
415	420	425
ggg tca cca gtt cgt gtt aag gac ctg aaa ctt ggc aca gat gaa gag aag gag		
Gly Ser Pro Val Arg Val Lys Asp Leu Lys Leu Gly Thr Asp Glu Glu Lys Glu		
435	440	445
aac ctg gca gtg tct ctc tgg aca gag tgt cta gtc cac gtg ctc tag		
Asn Leu Ala Val Ser Leu Trp Thr Glu Cys Leu Val His Val Leu ***		
455	460	465

【図面の簡単な説明】

【図 1】 この発明に係るヒト *mina 53* 遺伝子の構造を示す図。A はヒト *mina 53* 遺伝子のゲノミック構成を示す図。B はレポータープラスミドを示す図。C は T98Gmycer-2 細胞を使用したトランジェント発現アッセイの結果を示す図。

【図 2】

図 2 は *mina 53* mRNA の発現レベルを示す図。A は *mina 53* mRNA の発現レベルが T98G 細胞中の *c-myc* 発現レベルと関連していることを示す図。B はヒト前骨髄性白血病 HL60 細胞における *mina 53* mRNA の発現レベルの低下と *c-myc* mRNA の消滅との関係を示す図。C は MycER タンパク質を発現する T98G 細胞 (T98Gmycer-2 細胞) における *mina 53* mRNA の発現誘導を示す図。

【図 3】

図 3 は *Mina 53* のウエスタンブロッティング分析結果を示す図。A 左は Myc の活性化による *Mina 53* タンパク質の発現上昇を説明する図。A 右は TPA により Myc 発現を減少させたときの *c-Myc* タンパク質および *Mina 53* タンパク質の発現減小減少を説明する図。B はラット細胞にヒト *c-Myc* あるいは遺伝子発現上昇能を失った変異体 *c-Myc* を発現させたときの *Mina 53* タンパク質の発現変化 (Myc による発現上昇) を示す図。

【図 4】

HL60 細胞を使用したクロマチン免疫沈降実験結果を示す図。

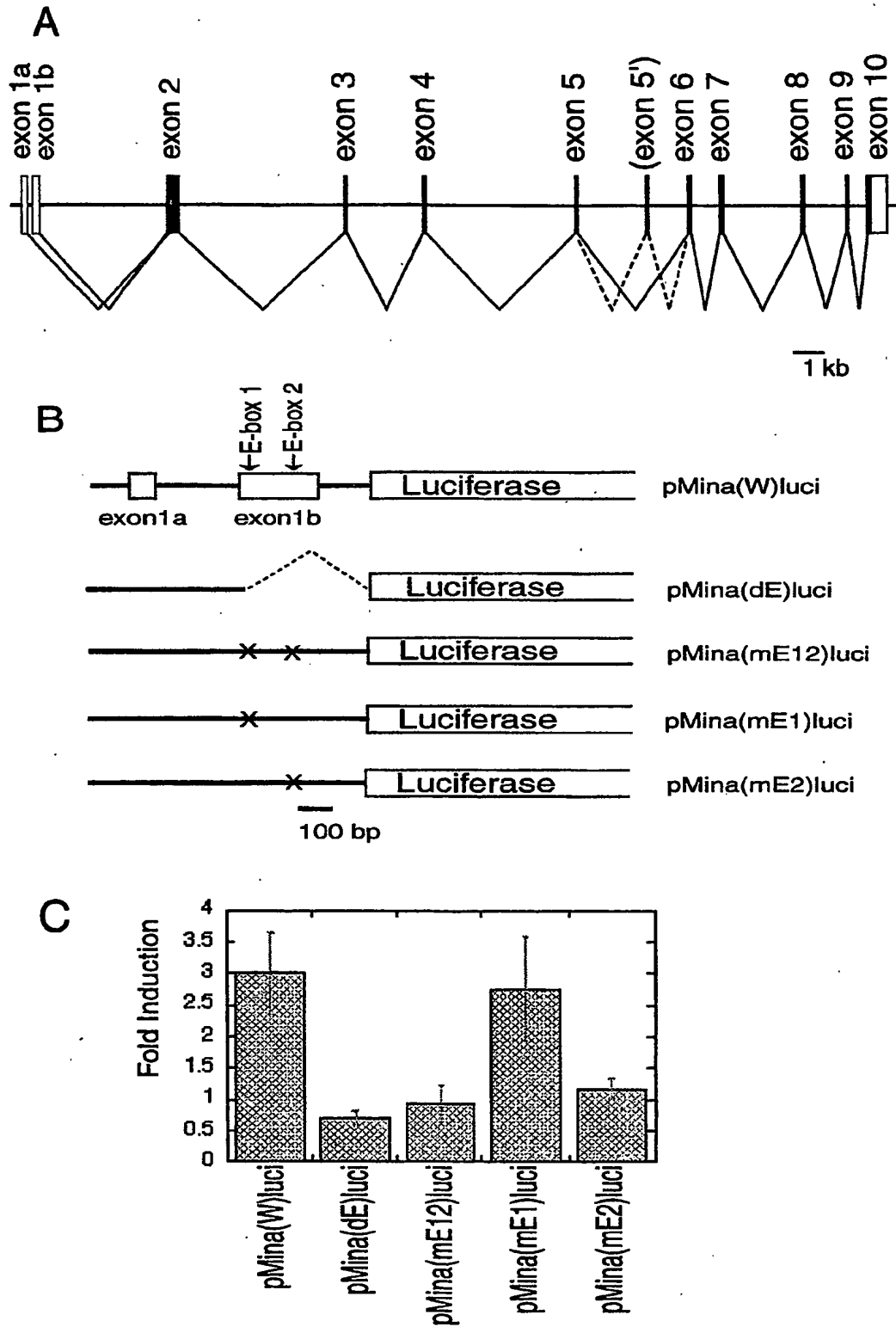
【図 5】

RNA干渉によるMina53タンパク質発現の減少とその細胞増殖に及ぼす効果を示す図。AはRNA干渉によるMina53タンパク質発現の減少を示す図。BはRNA干渉によりMina53タンパク質発現が減少した細胞の細胞増殖を示す図。図中、黒丸印はヒトmina53に特異的なsiRNA二本鎖を導入した細胞の様子を示す。黒三角印はラットmina53に特異的なsiRNA二本鎖を導入した細胞の様子を示す。白丸印はコントロールsiRNA二本鎖を導入した細胞の様子を示す。

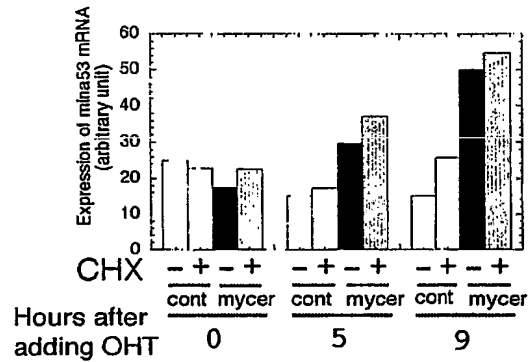
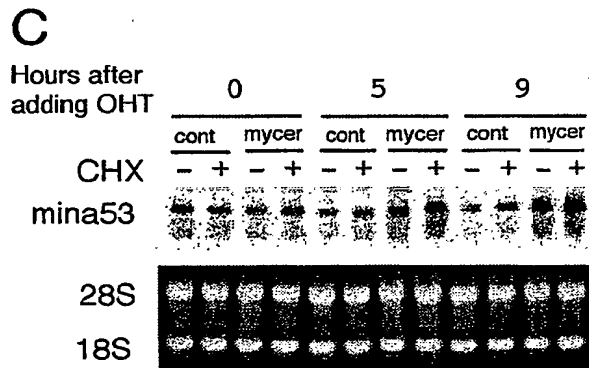
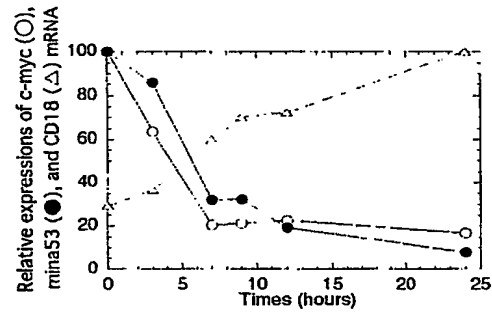
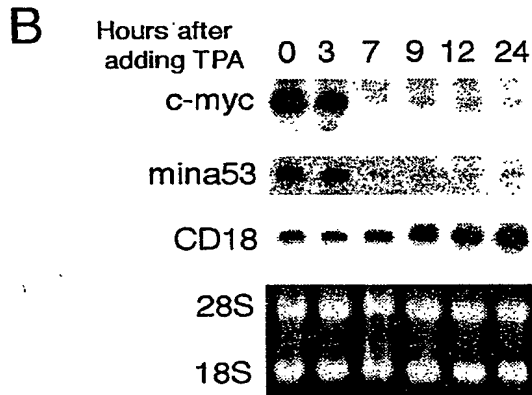
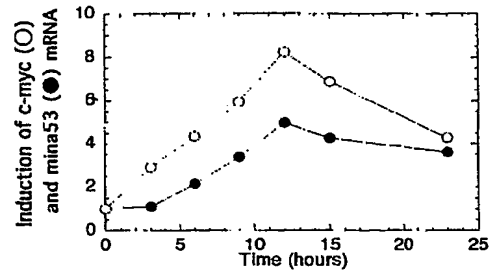
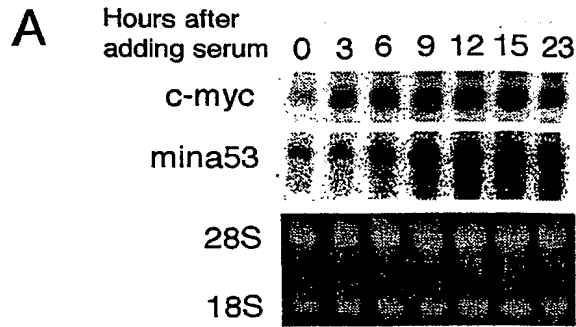
【書類名】

図面

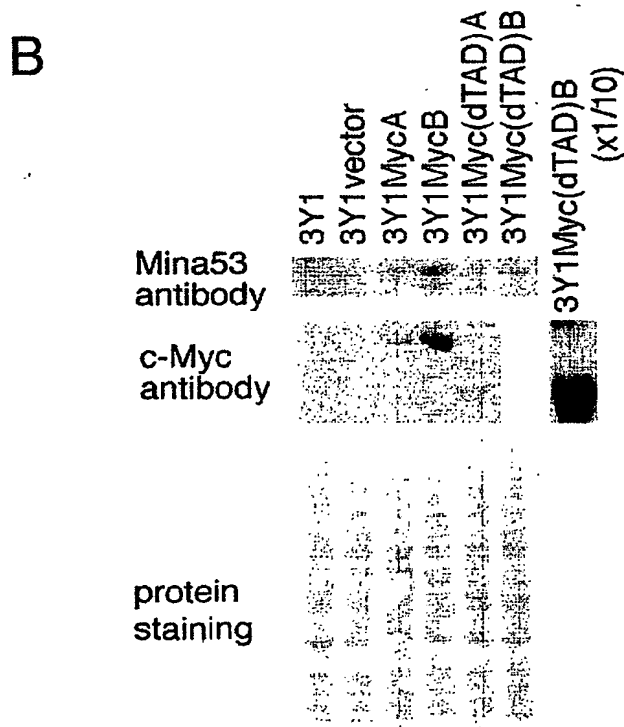
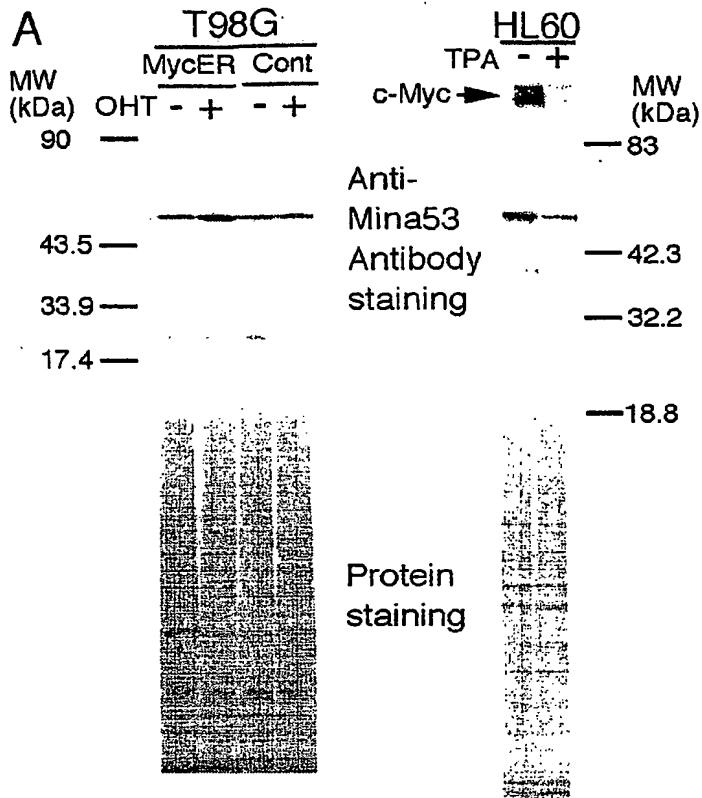
【図1】



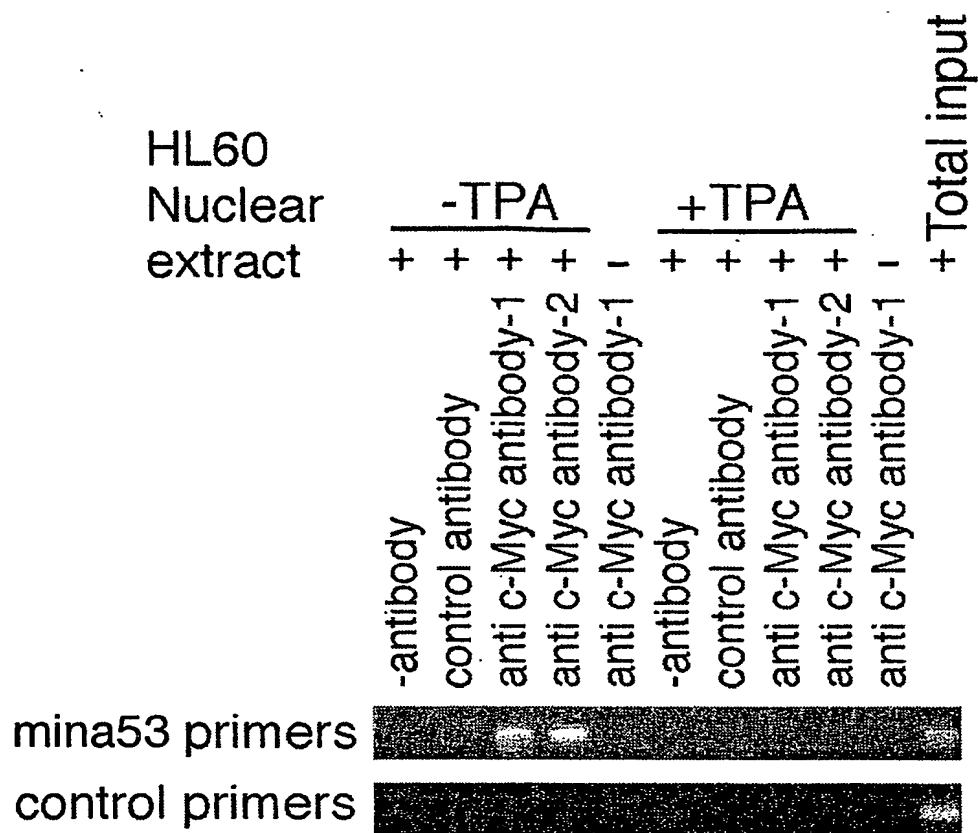
【図 2】



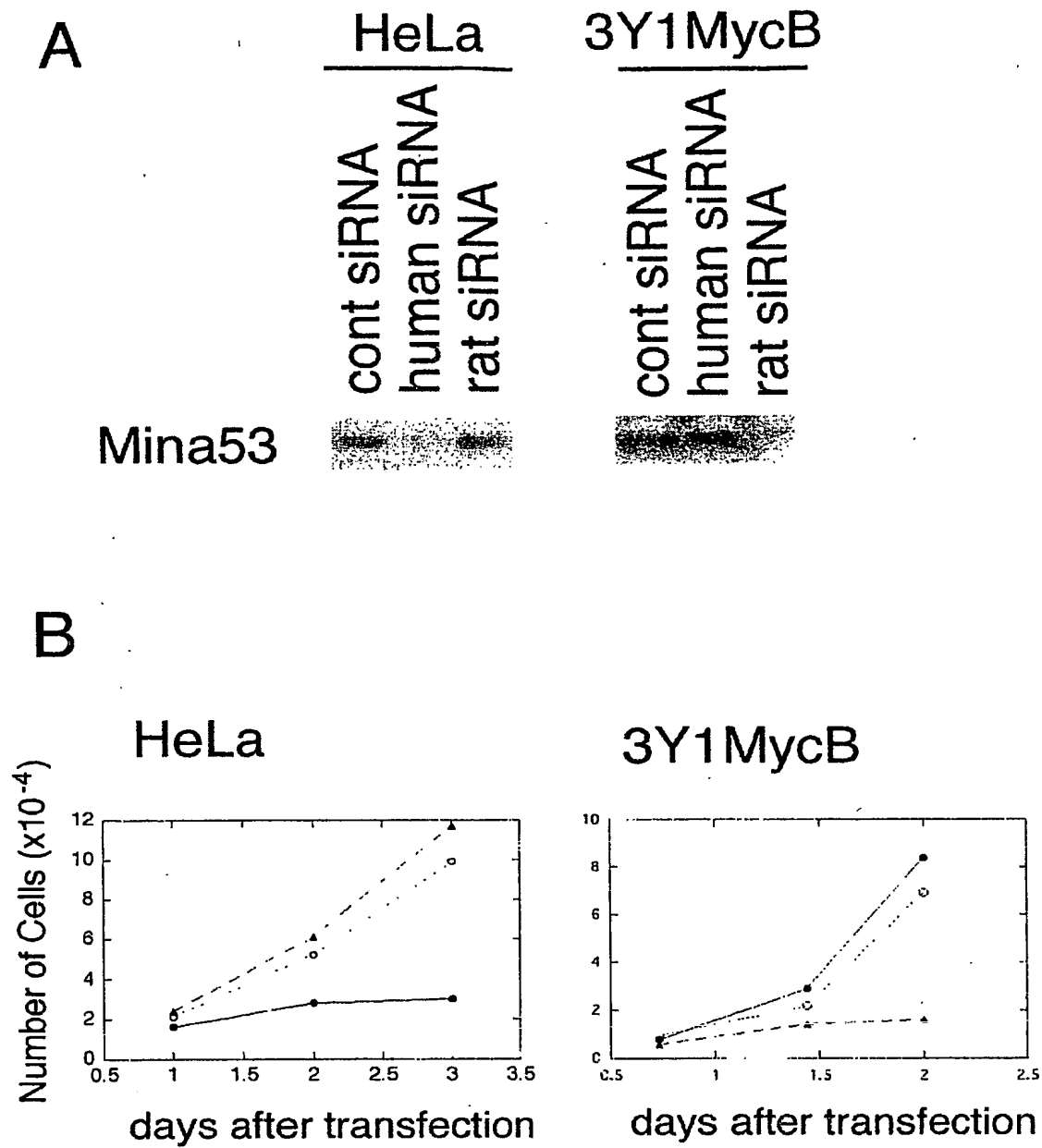
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

【解決手段】

My cタンパク質は細胞増殖の偏在性仲介物質であり、E-ボックスを介した遺伝子発現を活性化する。m i n a 5 3遺伝子は、分子量53 k D aを有するタンパク質をコードしていて、核質および核小体中に存在している。静止期にある細胞が血清によって活性化されたとき、c-m y c m R N Aのレベルの上昇に続き、m i n a 5 3 m R N Aを上昇した。ヒト前骨髄性白血病H L 6 0細胞中においてc-m y cの発現がT P Aによって減少したときには、m i n a 5 3 m R N Aとタンパク質は減少した。活性化ドメインを欠損した変異型c-M y cではなく、野生型c-M y cの異所性発現はm i n a 5 3の発現を上昇した。m i n a 5 3 m R N Aとタンパク質の発現はc-M y cの活性の人為的導入によって誘発される。c-M y c E Rキメラタンパク質ちゅうキメラタンパク質中のc-M y cが活性化したときに、タンパク質合成に対するインヒビターが存在してもm i n a 5 3 m R N Aが増加する。m i n a 5 3遺伝子の転写開始部位に近接してE-ボックス部位があり、m i n a 5 3プロモーターからの発現は、E-ボックスを介してc-M y cによって活性化される。c-M y cタンパク質は、T P A処理後ではなく、増殖相のH L 6 0におけるインビボ (i n v i v o) でのm i n a 5 3プロモーター領域に結合している。H e L a細胞中と、高発現するc-m y cを有するラット繊維芽細胞3 Y 1細胞中でのm i n a 5 3発現の特異的抑制は細胞増殖を著しく抑制した。これらの結果を合わせると、m i n a 5 3はM y c標的遺伝子であり、哺乳動物の細胞増殖への関連を示している。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599045903]

1. 変更年月日	1999年 3月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	福岡県久留米市旭町67番地
氏 名	学校法人 久留米大学